

Joana Gonçalves Moreira

.....

Administração oral de insulina: realidade ou ficção?

.....

Orientador: Professora Doutora Ana Catarina Beco Pinto Reis

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias de Saúde

Lisboa
2017

Joana Gonçalves Moreira

.....

Administração oral de insulina: realidade ou ficção?

.....

Dissertação defendida em provas públicas para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 18 de Janeiro de 2017 perante o Júri com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Dulce Várzea (ULHT)

Arguente: Professora Doutora Patrícia Rijo (ULHT)

Orientador: Professora Doutora Ana Catarina Pinto Reis (ULHT)

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias de Saúde

Lisboa

2017

Nome

Joana Gonçalves Moreira

Departamento

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Orientador

Professora Doutora Ana Catarina Pinto Reis

Título da dissertação

Administração oral de insulina: realidade ou ficção?

Presidente júri

Professora Doutora Dulce Várzea

Vogais

Professora Doutora Ana Mirco

Professora Doutora Patrícia Rijo

Live as if you were to die tomorrow.

Learn as if you were to live forever.

Mahatma Gandhi

Dedicatória

Dedico a presente dissertação aos meus pais e à minha irmã que tornaram possível a realização do meu sonho de me tornar farmacêutica. Sempre me apoiaram e ajudaram nos momentos difíceis, e celebraram comigo as vitórias e sucessos alcançados.

A eles lhes devo tudo o que até agora alcancei.

Agradecimentos

O presente trabalho não teria sido possível sem a ajuda e o apoio daqueles a que agora me refiro, a todos os mais sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha professora orientadora, Doutora Catarina Pinto Reis, que me incentivou a seguir a cadeira de projeto que deu depois origem a este trabalho. Foi sempre incansável, e esteve sempre pronta a ajudar fosse quando fosse, dando as ferramentas necessárias para que eu pudesse aprender a pensar por mim, pesquisasse e desenvolvesse as minhas capacidades.

Quero também agradecer a todos os meus amigos e colegas do laboratório que sempre me ajudaram e se mostraram disponíveis para tirar as minhas dúvidas.

Um especial obrigada à minha amiga e colega, Ana Rita Carvalho, que sempre me motivou a continuar e a não desistir, e me ensinou a ser mais persistente e lutadora.

Um obrigado a todos os professores do curso que fazem de tudo para manter o espírito inovador e criativo nos alunos. Agradeço diretamente aos Professores Doutora Marisa Nicolai, Doutora Patrícia Rijo, Doutor Nuno Saraiva e Doutora Tânia Almeida, todos eles da ULHT, que me ajudaram em algumas fases do projeto.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, principalmente, à Professora Doutora Isabel Vitória Figueiredo e aos alunos Mariana Silveira e Pedro Gonçalves, da mesma faculdade, que disponibilizaram o biotério e os animais, e colaboraram na realização dos ensaios *in vivo*.

À Professora Doutora Lia Ascensão, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, que permitiu a obtenção de imagens SEM das nanopartículas.

À Professora Doutora Maria-Eduardo Figueira da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa que disponibilizou material e esteve envolvida nos ensaios *ex vivo* realizados.

Ao Professor Doutor Pedro Faísca pelo estudo histológico que realizou aos intestinos dos ratos.

À Professora Doutora Isabel Correia do Instituto Superior Técnico disponibilizou-se para a realização dos estudos de dicroísmo circular.

E por último, o meu maior agradecimento, à minha família que foi sempre o meu pilar. Aos meus pais, que tudo fizeram para que isto se tornasse real, à minha irmã de quem tanto me orgulho e ao meu namorado que sempre me deu forças para fazer mais e melhor.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABELAS	II
RESUMO	III
<i>ABSTRACT</i>	IV
ABREVIATURAS	IV

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1.1. A INSULINA	2
1.2. A DIABETES	5
1.2.1. Tratamentos já existentes	9
1.3. NANOMEDICINA NO TRATAMENTO DA DIABETES.....	12
1.3.1. Nanopartículas Poliméricas	12
1.3.2. Nanopartículas como Sistema de veiculação de insulina.....	13
1.3.3. Administração oral de insulina.....	16

CAPÍTULO II – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1. OBJETIVO DO TRABALHO.....	19
2.2. Composição das nanopartículas	19
a) Justificação dos polímeros utilizados	19
b) Justificação do método utilizado	21
c) Justificação da utilização de líquidos iónicos	22
2.3. Materiais	23
2.4. Métodos	23
2.4.1 Preparação de nanopartículas de PLGA com insulina.....	23
2.4.2 Caracterização das nanopartículas	24

a) Análise do tamanho de partícula.....	24
b) Análise do potencial zeta	25
c) Análise da superfície e morfologia das partículas	25
d) Eficiência de Encapsulação	25
e) Rendimento de Recuperação	26
2.4.3 Atividade da Insulina	26
a) <i>Por ELISA</i>	26
b) <i>Por DC</i>	27
2.4.4 Ensaio de libertação <i>in vitro</i>	27
2.4.5 Transporte intestinal : Ensaio <i>ex vivo</i>	28
2.4.6 Ensaio eficácia <i>in vivo</i>	28
a) Indução da Diabetes	29
b) Determinação da glicémia	29
c) Desenho experimental.....	29
d) Análise Estatística.....	30

CAPÍTULO III – APRESENTAÇÃO E TRATAMENTO DOS RESULTADOS

3.1. Preparação de nanopartículas de PLGA com insulina.....	31
3.2. Tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e morfologia	31
3.3. Eficiência de Encapsulação (EE) da insulina nas NPs	34
3.4. Rendimento de Recuperação (RR) do processo de preparação NPs	34
3.5. Atividade da insulina após encapsulação nas NPs	35
3.6. Ensaio de libertação <i>in vitro</i> da insulina	36
3.7. Transporte intestinal: ensaio <i>ex vivo</i>	36
3.8. Ensaio de eficácia <i>in vivo</i>	37

CAPÍTULO IV - CONCLUSÃO

CAPÍTULO V – PERSPETIVAS FUTURAS

CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....

CAPÍTULO VII - ANEXOS

Índice de Figuras

Figura 1-Esquema da biossíntese de insulina desde pré-insulina a insulina	2
Figura 2 - Controlo da secreção da insulina	3
Figura 3- Esquema do mecanismo de ação da insulina	4
Figura 4- Dados da prevalência da Diabetes Mellitus no Mundo em 2014	6
Figura 5- Esquema ilustrativo dos principais tipos de DM	8
Figura 6 - Esquema ilustrativo das complicações associada ao DM	9
Figura 7- Imagem demonstrativa da administração de insulina por via subcutânea	10
Figura 8 - Esquema ilustrativo da absorção, distribuição e eliminação da insulina administrada por via oral e s.c.....	11
Figura 9- Esquema ilustrativo dos dois tipos de nanopartículas poliméricas.....	12
Figura 10- Mecanismos de transporte através das células epiteliais	16
Figura 11- Esquema ilustrativo do TGI e os vários obstáculos a ultrapassar na administração oral.....	16
Figura 12 - Esquema demonstrativo da constituição das nanopartículas poliméricas preparadas	19
Figura 13- Efeito do CS na absorção de fármacos pela via paracelular	21
Figura 14- Algumas das possíveis áreas e aplicações dos líquidos iónicos	23
Figura 15- Preparação de NPs pelo método de emulsificação espontânea por deslocamento do solvente.....	24
Figura 16- Imagem da suspensão de nanopartículas após preparação e revestimento	32
Figura 17- (A) Distribuição dos valores de diâmetro das NPs (B) Potencial zeta das NPs finais.	33
Figura 18- Imagens SEM das NPs de insulina: (A) NPs vazias; (B) NPs de insulina; (C) NPs de insulina com LI.....	34
Figura 19- Espectro de DC da Insulina Comercial (Actrapid 100 UI/mL); Insulina das NPs; Insulina das NPs com LIs	35
Figura 20- Influência na glicémia das formulações administradas oralmente a ratos diabéticos	37
Figura 21- Influência na glicémia das formulações administradas oralmente a ratos diabéticos	38

Índice de Tabelas

Tabela 1- Desvantagens associadas à administração contínua de insulina por via s.c.	11
Tabela 2- Vantagens e desvantagens de vias de administração de insulina alternativas.....	15
Tabela 3- Resumo de formulações de insulina por via oral, em ensaios clínicos.	17
Tabela 4 - Resultados do sucesso e insucesso alcançados com a produção das NPs de insulina	41

Resumo

A Diabetes é considerada por muitos como um dos maiores problemas de Saúde em todo o Mundo, onde cerca de 387 milhões de pessoas têm a doença diagnosticada, sendo que este valor tende a aumentar. É, por isso, considerada por muitos autores a epidemia do século XXI. Esta é uma doença que não tem cura, daí a procura constante de novos tratamentos inovadores, e mais cómodos para o doente. Na *Diabetes Mellitus* tipo 1 há a necessidade constante, durante toda a vida, da administração exógena da hormona. Uma vez que esta é administrada por via subcutânea, torna-se desconfortável para o doente, podendo até levar a reações alérgicas no local de administração tais como lipodistrofias, e daí a preocupação de encontrar uma outra forma de administração, sendo a preferencial a via oral. Contudo, alguns problemas relacionados com natureza proteica fazem desta tarefa um grande desafio uma vez que a fraca estabilidade da insulina à degradação proteolítica e hidrolítica, baixa permeabilidade intestinal e tempo de semi-vida curto na circulação sistémica, levam consequentemente a uma fraca absorção intestinal. Para ultrapassar todos os problemas associados à natureza proteica, recorreu-se a nanotecnologia para veiculação do fármaco. Para tal utilizaram-se nanopartículas poliméricas constituídas por poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA). Esta abordagem apresentou resultados promissores, não só devido ao tamanho reduzido que confere uma elevada área de contato entre a superfície da partícula e a célula intestinal, mas também pela proteção enzimática e aumento do tempo de semi-vida da insulina.

Palavras-chave: administração oral, nanotecnologia, Diabetes, proteína, insulina, PLGA, líquidos iónicos.

Abstract

Diabetes is considered by many people as one of the biggest health problems in the world where about 387 million people have been diagnosed, and this value tends to increase. Therefore, it is considered by many authors the epidemic of the XXI century. This is a disease that has no cure, hence the constant search for new innovative treatments and more comfortable for the patient. In type 1 there is a constant need for the entire life from exogenous administration of the hormone. Since this is administered subcutaneously, it becomes uncomfortable for the patient and may even lead to allergic reactions at the injection site such as lipodystrophy, hence the concern to find another route of administration, and the preferential is the oral administration. However, some problems related with protein nature makes this task a big challenge since the poor stability of insulin mainly due to hydrolytic and proteolytic degradation, poor intestinal permeability and a short half-life time in the systemic circulation, leading to poor intestinal absorption. For overcoming all the problems associated with protein nature, nanoparticles may be considered a great strategy. For this purpose we prepared polymeric nanoparticles composed by poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA). This approach has been giving promising results, not only due to the particle small size that leads to a high contact area between the particle surface and intestinal cell, but also by enzymatic protection which confers and increase of half-life time of insulin.

Key-words: oral delivery, nanotechnology, Diabetes, protein, insulin, PLGA, ionic liquids.

Abreviaturas

BHE – Barreira Hemato-encefálica
CS - Quitosano
DC – Dicroísmo Circular
DG – Diabetes Gestacional
DGS – Direção Geral de Saúde
DM – *Diabetes Mellitus*
DPP-4 – Dipeptil Peptidase
EE – Eficiência de Encapsulação
FDA – Food and Drug Administration
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IP – Índice de Polidispersão
LI – Líquidos Iônicos
Np – Nanopartícula
OMS – Organização Mundial de Saúde
PEG - Polietilenoglicol
PLGA - Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PM – Peso Molecular
RR – Rendimento de Recuperação
SC – Subcutâneo
SEM – Microscopia Eletrônica de Varrimento
STZ - Streptozotocina
TEM – Microscopia de Transmissão Eletrônica
TG – Trato Gastrointestinal

Capítulo I - Introdução

1.1 A Insulina

A insulina foi isolada, pela primeira vez, em 1921 por Banting e Best. Porém, só 35 anos mais tarde é que a sua sequência de aminoácidos foi conhecida e demonstrada, por Sanger que ganhou por isso o prémio Nobel da Química. Mais tarde, Katsoyannis conseguiu sintetizar a insulina. Esta foi a primeira proteína cuja estrutura foi elucidada e desde então permitiu a análise de muitos outros polipéptidos e proteínas biologicamente ativos (Goulão 2007; Reis 2008). Quanto à estrutura química, a insulina (Figura 1) é um dipéptido de PM de 6 KDa composto por dois péptidos A e B com a seguinte composição: A - 21 aminoácidos (cadeia ácida) e B - 30 aminoácidos (cadeia básica) (Goulão 2007). Este polipéptido é secretado sob a forma de pré-insulina pelas células β que constituem os ilhéus pancreáticos de Langerhans. Após a sua síntese, esta é transportada para o retículo endoplasmático e por ação das enzimas proteolíticas, é clivada a pro-insulina. A conversão de pro-insulina em insulina (processo ativo) ocorre por clivagem proteolítica no aparelho de Golgi com perda do polipéptido C (Goulão 2007; Chari 2014; Chhabra 2012). A insulina sintetizada é, então, armazenada em grânulos no citoplasma. Quando ocorre um estímulo, dá-se a secreção de insulina por um processo de exocitose, originando a libertação da mesma para o espaço extracelular (Goulão 2007).

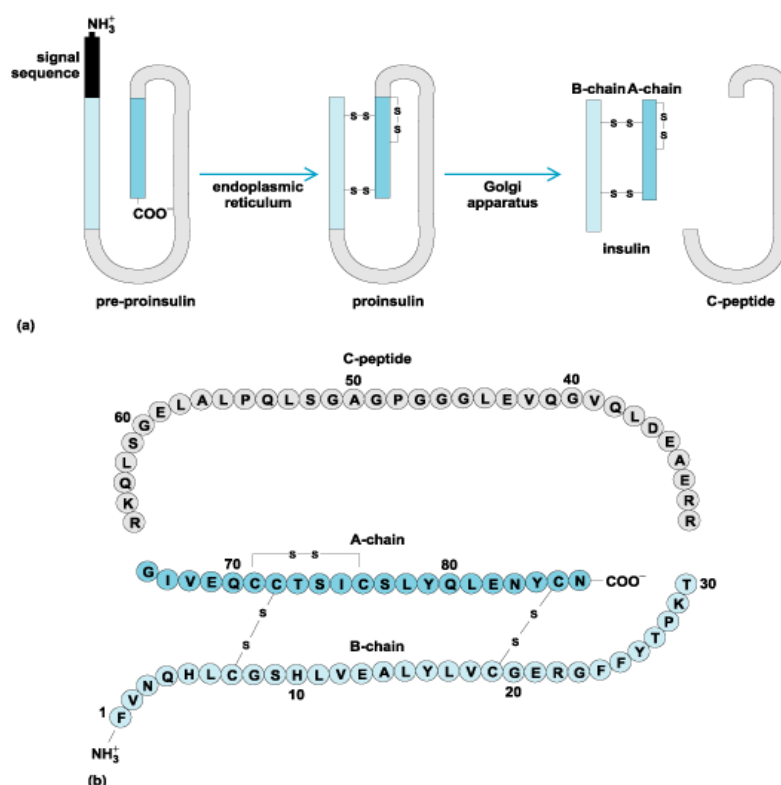


Figura 1-Esquema da biossíntese de insulina desde pré-insulina a insulina, retirado de Chhabra et al. (Chhabra 2012).

Existem vários ativadores dessa secreção de insulina sendo que a glicose é o principal. Quando ocorre uma estimulação do pâncreas por um aumento da concentração de glicose, a secreção de insulina segue um processo dividido em duas fases. Numa primeira fase é libertada a insulina disponível de forma imediata, e numa segunda fase, que é a mais longa, os grânulos do interior da célula são transportados para a periferia através dos microtúbulos, após o que o seu conteúdo é lançado para o exterior (Goulão 2007) (Figura 2). Isto acontece porque é detetado um aumento, acima dos valores basais, de glicose sérica, sendo que é essencial a produção de insulina para a captação da mesma para dentro das células, onde é necessária para produzir energia.

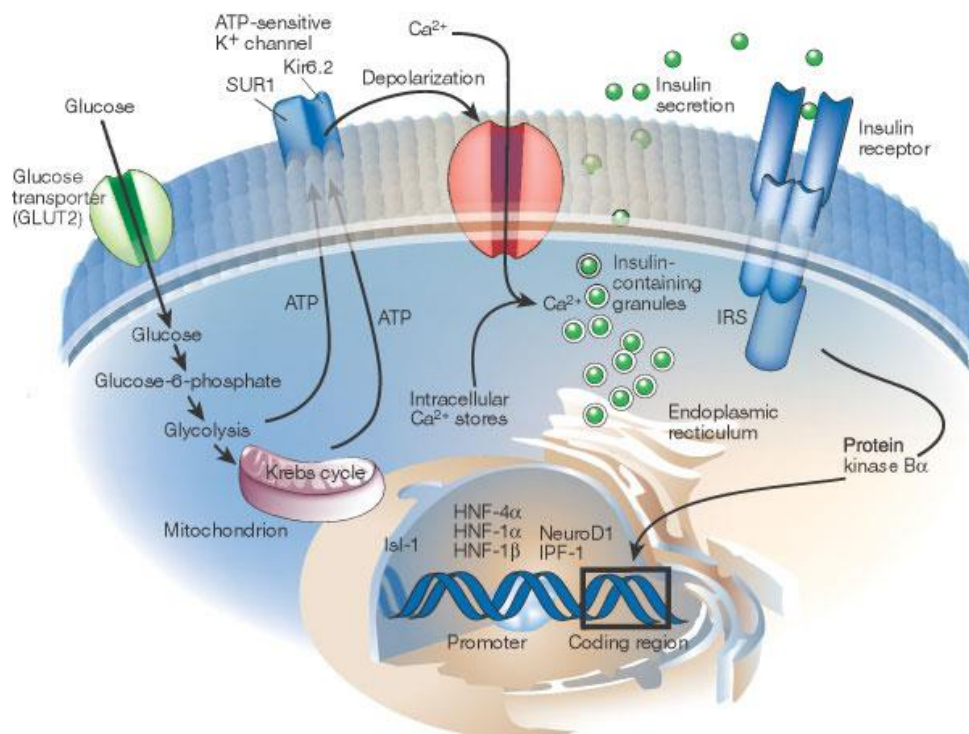


Figura 2 - Controle da secreção da insulina: O esquema mostra o mecanismo que controla a secreção de insulina que é iniciada com um aumento da glicose sérica. Esta leva a uma libertação imediata de insulina já sintetizada e armazenada em grânulos no interior da célula, leva ainda a uma maior síntese da mesma, retirado de Graeme e Kenneth (Graeme & Kenneth 2001).

Para além da glicose, existem alguns aminoácidos, como a arginina e leucina que tendem a estimular a secreção de insulina. Também existem hormonas tais como a gastrina, pancreatozimina-colescistocinina, secretina e entero-glicagina, que potenciam a ativação da secreção. A glicagina, hormona secretada pelas células A do pâncreas, quando em concentrações elevadas promove também a secreção da insulina. A acetilcolina induz a abertura dos canais para a entrada de cálcio. Diversas hormonas hiperglicemiantes aumentam a

resistência periférica à insulina, entre elas, a hormona adrenocorticotrófica (ACTH), a hormona estimuladora da tiroideia (TSH), a hormona de crescimento (GH), cortisol, progesterona e estrogénios (Goulão 2007).

Após ocorrer um estímulo, a insulina é secretada e libertada, ligando-se a um recetor específico presente nas membranas celulares e intracelulares das células-alvo. O recetor para a insulina tem atividade de tirosina cinase, e é composto por duas subunidades, a α e a β . A insulina liga-se à subunidade α , ativando a tirosina cinase presente na subunidade β , e iniciando uma cascata de fosforilação de proteínas da célula. A consequência disto é o aumento da captação de glicose e síntese de glicogénio, bem como aumento da síntese de triglicéridos e proteínas (Goulão 2007; Chari 2014; Graeme & Kenneth 2001; Chhabra 2012).

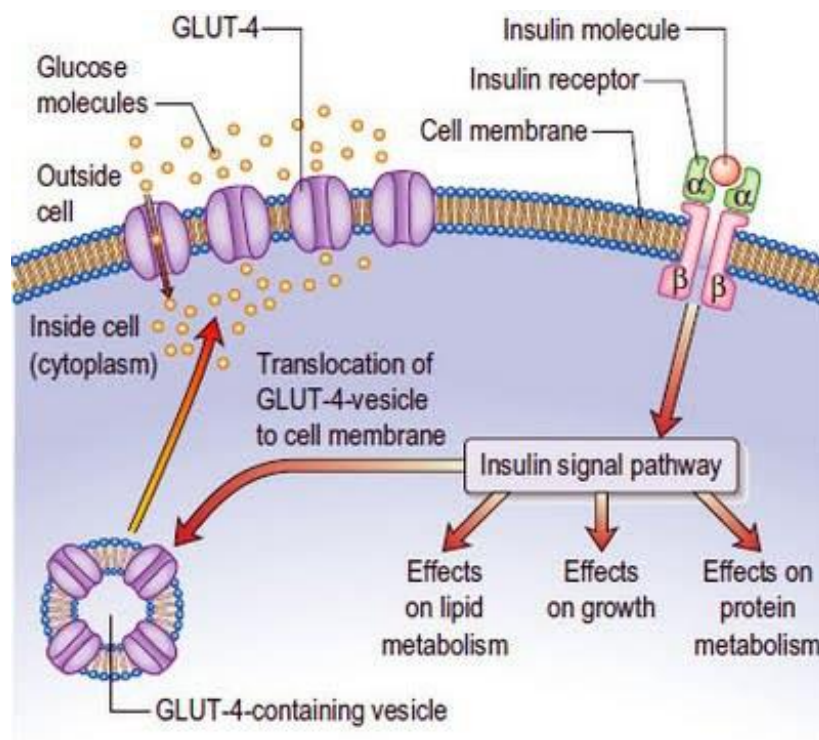


Figura 3- Esquema do mecanismo de ação da insulina: A insulina libertada liga-se aos recetores específicos existentes na membrana da célula, ativando uma cascata de fosforilação, levando assim à translocação da vesícula GLUT-4 para a membrana e permitindo a entrada da glicose para o meio intrínseco, retirado de Chhabra (Chhabra 2012).

1.2 A Diabetes

Quando o mecanismo de ação da insulina ocorre como é suposto, num organismo saudável, é possível manter o equilíbrio da concentração de glucose sérica e intracelular. Contudo, existem situações em que a produção de insulina não é suficiente e/ ou não é eficaz, sendo que nesses casos estamos perante uma patologia designada por *Diabetes Mellitus* (DM), conhecida também como apenas Diabetes. Esta é uma desordem metabólica, de etiologia múltipla, caracterizada por um aumento de glicose no sangue (hiperglicémia) com distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, resultantes da ausência de produção de uma hormona, a insulina, da ação ineficiente da mesma, ou ambas (Infarmed 2016; Sharma et al. 2015). Esta é uma patologia crónica que deve ser controlada diariamente, pois não tem cura e pode levar a várias complicações (Sociedade Portuguesa de Diabetologia/ Observatório Nacional da Diabetes 2014a; Alberti et al. 2011; Direção-Geral da Saúde 2011; WHO 2006).

Segundo a Norma DGS n.º 2/2001, de 14/01/2011, os critérios de diagnóstico de DM são os seguintes (Direção-Geral da Saúde 2011; WHO 2006; Sociedade Portuguesa de Diabetologia/ Observatório Nacional da Diabetes 2014a):

- a) Glicémia de jejum ≥ 126 mg/dL (ou $\geq 7,0$ mmol/L);
- b) Sintomas clássicos de descompensação + Glicemia ocasional ≥ 200 mg/dl (ou $\geq 11,1$ mmol/L);
- c) Glicemia ≥ 200 mg/dL (ou $\geq 11,1$ mmol/L) às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75g de glicose;
- d) Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5$ %.

Esta patologia é já considerada por muitos como a pandemia do século XXI, sendo que as previsões não são animadoras. Dados mais recentes sobre a prevalência da diabetes no mundo estimam que cerca de 387 milhões de pessoas têm a doença diagnosticada, sendo que este valor tende a aumentar, em 2035 estima-se que o número de doentes aumente para 592 milhões de pessoas. Apesar da DM atingir todas as idades, esta é mais prevalente em pessoas entre os 40 e os 59 anos de idade. Com o aumento de incidência em todo o mundo, cerca de 179 milhões de pessoas com diabetes ainda não estão diagnosticadas e a cada sete segundos morre um diabético no mundo (4,9 milhões de mortes em 2014) (IDF 2013). Em Portugal e em 2014, a prevalência

estimada da DM na população com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos (7,7 milhões de indivíduos) foi de 13,1%, isto é, mais de 1 milhão de portugueses neste grupo etário tem DM (Infarmed 2016; Sociedade Portuguesa de Diabetologia/ Observatório Nacional da Diabetes 2014a).

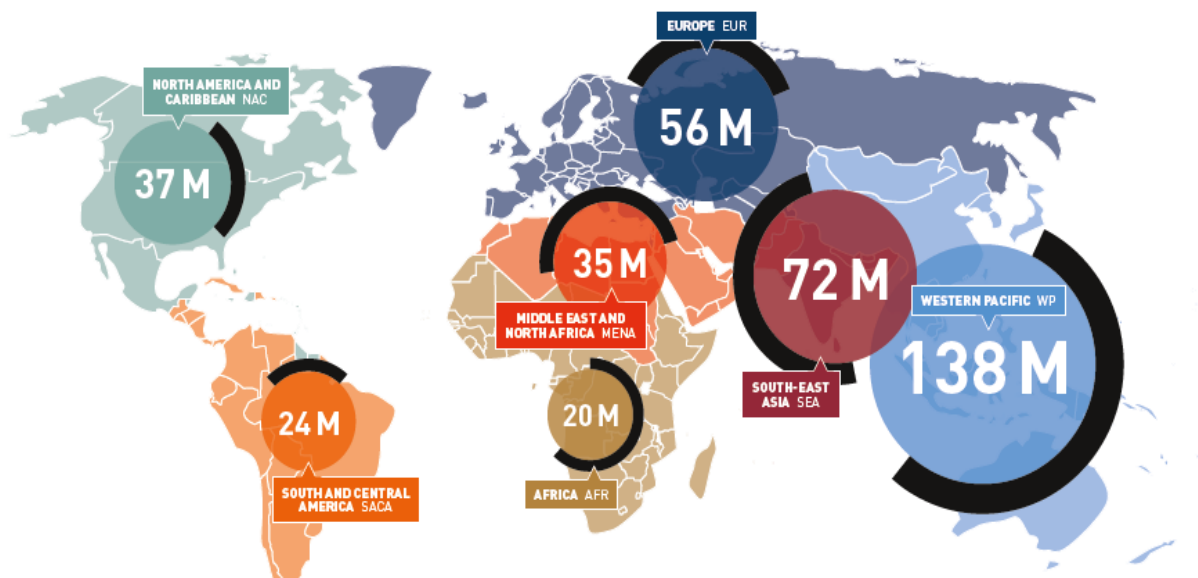


Figura 4- Dados da prevalência da Diabetes Mellitus no Mundo em 2014: Segundo dados de 2013 da IDF, a Europa tem cerca de 56 Milhões de diabéticos, retirado de Douglas et al. (IDF 2013).

Muitas são as razões apontadas para o aumento da DM no Mundo, sendo que o principal fator é o estilo de vida sedentário, a poluição e a má alimentação. Contudo, existem fatores incontrolláveis, quando se trata de influência genética. A sua classificação foi sendo alterada ao longo do tempo. A primeira classificação amplamente aceite de *Diabetes Mellitus* foi publicada, pela OMS, em 1980 e, numa forma modificada, em 1985. Essa classificação incluía duas grandes classes: diabetes insulino dependentes, correspondendo à diabetes tipo 1, e a diabetes não insulino dependentes, correspondendo à diabetes tipo 2. Atualmente, esta classificação caiu em desuso uma vez que tinha apenas como base o tratamento e não a patogénese (Alberti et al. 2011). A atual classificação divide a DM em quatro classes clínicas (Direção-Geral da Saúde 2011; WHO 2006):

- ✓ Diabetes tipo 1- A DM tipo 1 é causada por uma reação autoimune, na presença de anticorpos anti-GAD (descarboxilase do ácido glutâmico) e anticorpos contra as células dos ilhéus e contra a insulina, que se deve à destruição das células β dos ilhéus pancreáticos, que são responsáveis pela produção de insulina, levando a uma diminuição ou ausência da produção da mesma (Direção-Geral da Saúde 2011; IDF 2013;

Sociedade Portuguesa de Diabetologia/ Observatório Nacional da Diabetes 2014a). Este é um tipo de diabetes menos comum (< 10% do total de casos de DM), e surge normalmente em crianças e jovens, mas pode também surgir em adultos e idosos (WHO 2006). A sua etiologia ainda não está completamente compreendida mas os fatores ambientais e genéticos, e a exposição a certas infeções virais parecem ter um papel preponderante (Sociedade Portuguesa de Diabetologia/ Observatório Nacional da Diabetes 2014a). Neste tipo de diabetes, a pessoa fica dependente de insulina exógena.

- ✓ Diabetes tipo 2 – A DM tipo 2 dá-se quando o organismo não produz a quantidade de insulina suficiente e/ou quando esta não é utilizada eficazmente, isto é, quando há uma resistência à sua ação. Este é o tipo de diabetes mais comum, e surge normalmente a partir dos 40 anos. Contudo, cada vez mais surgem jovens e até crianças com DM tipo 2. Ao contrário da DM tipo 1, as pessoas com DM tipo 2 não são dependentes de insulina exógena e não são propensas a cetose, mas podem necessitar de insulina para o controlo da hiperglicémia se não o conseguirem através da dieta associada a antidiabéticos orais. O aumento da prevalência desta patologia está estreitamente associado às mudanças sociais e comportamentais, tais como os hábitos alimentares e sedentarismo, mas também ao envelhecimento da população (Alberti et al. 2011; WHO 2006; Sociedade Portuguesa de Diabetologia/ Observatório Nacional da Diabetes 2014a; IDF 2013).
- ✓ Diabetes Gestacional – A DG ocorre frequentemente (cerca de 1 em 20 grávidas) (Direção-Geral da Saúde 2013). Este é o tipo de diabetes que surge durante a gravidez e está associada a uma intolerância à ação da glicose. Se controlados os valores de glicémia, reduz-se o risco para o recém-nascido. Caso contrário, o aumento dos mesmos poderá resultar em complicações, nomeadamente, macrosomia, traumatismo de parto, hipoglicémia e icterícia (Sociedade Portuguesa de Diabetologia/ Observatório Nacional da Diabetes 2014a). Sabe-se que as mulheres que tiveram DG apresentam um risco aumentado de desenvolver DM tipo 2 nos anos seguintes.
- ✓ Outros tipos de Diabetes – Existem, ainda, outros tipos de diabetes que não se enquadram em nenhuma categoria específica e são menos frequentes. As causas são diversas tais como defeitos nas células β , alterações da ação da insulina, doenças que

afetam o pâncreas, endocrinopatias diversas, infecções e utilização de alguns fármacos ou químicos.

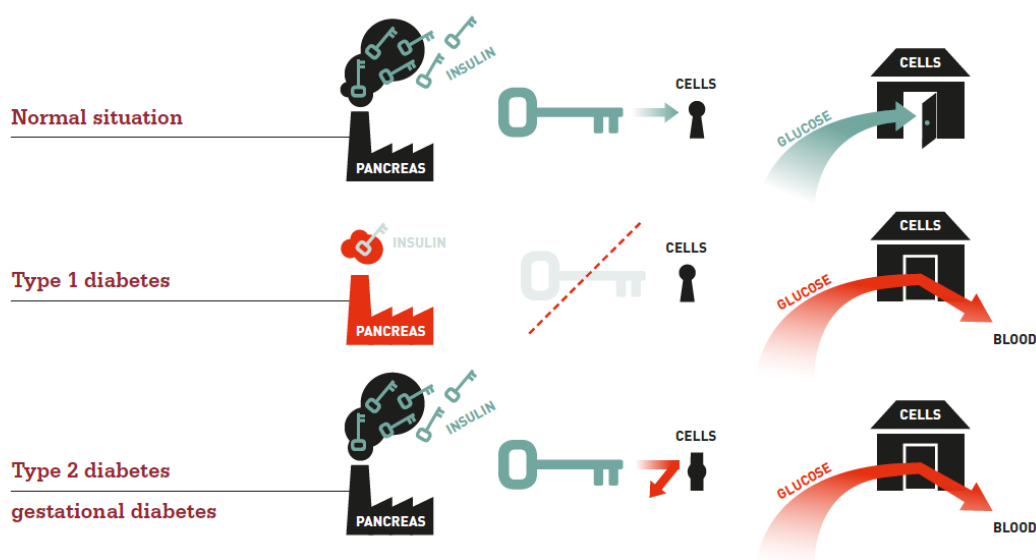


Figura 5- Esquema ilustrativo dos principais tipos de DM: Este esquema mostra de uma forma simples os vários tipos de diabetes, em que a chave é a insulina e a fechadura os receptores específicos existentes na membrana celular. No caso da DM tipo 1 não há sequer produção de insulina, enquanto que no caso da DM tipo 2 ou gestacional, a produção de insulina é insuficiente ou ineficaz, retirado da 6ª edição do Atlas da Diabetes (IDF 2013).

A persistência dos níveis elevados de glicose, mesmo não existindo sintomas sugestivos de Diabetes, podem resultar em lesões nos tecidos, sendo os principais órgãos afetados os rins, olhos, nervos periféricos e sistema vascular, podendo resultar neuropatias e amputações, retinopatias, nefropatias e doenças cardiovasculares (Reis 2008).

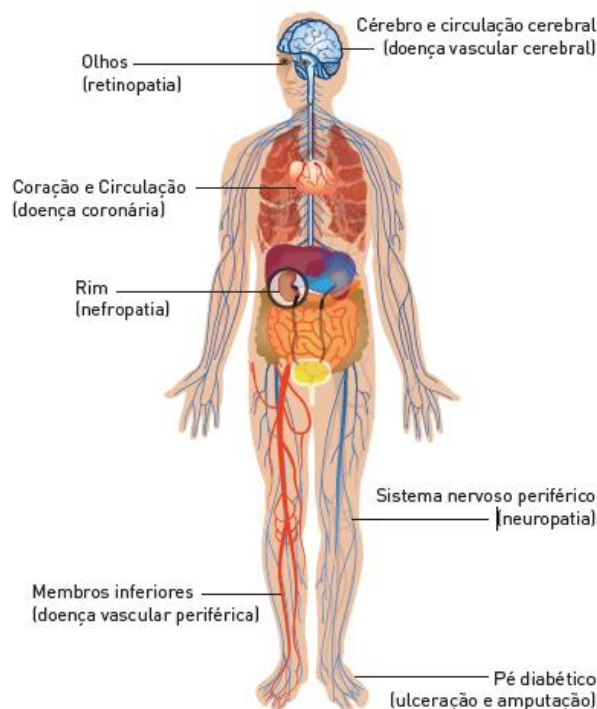


Figura 6 - Esquema ilustrativo das complicações associada ao DM. Retirado do Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes (Sociedade Portuguesa de Diabetologia/ Observatório Nacional da Diabetes 2014a)

1.2.1. Tratamentos existentes

A diabetes é uma disfunção metabólica que não tem cura. Contudo, é possível controlar e prevenir as suas complicações através de uma alimentação saudável e equilibrada, prática de exercício físico e antidiabéticos orais e/ou insulina. É também importante conhecer bem a doença e os seus riscos e controlar frequentemente os valores de glicémia. Quanto à medicação realizada, varia consoante o tipo de diabetes (Sociedade Portuguesa de Diabetologia/ Observatório Nacional da Diabetes 2014b) .

A DM tipo 2 numa fase inicial pode ser controlada apenas alterando os hábitos alimentares e evitando o sedentarismo. Porém, na maioria das vezes, é necessário recorrer a antidiabéticos orais que podem ser de diversos grupos, tais como as biguanidas, sulfonilureias, metiglinidas, inibidores das alfa-glicosidases, tiazolidinedionas e inibidores da DPP-4 (Elçioğlu & Sezer 2014). Existem ainda associações entre vários medicamentos. Este tipo de medicação visa estimular a produção de insulina, aumentar a sensibilidade do organismo à insulina, reduzindo

a resistência à ação da mesma e inibir a degradação da insulina. Existem casos em que é necessário insulino-terapia de forma a controlar a glicémia.

Quanto à DM tipo 1 o único tratamento existente é a insulina por via subcutânea (s.c.), pois neste caso como o organismo não produz a proteína é necessária administração exógena da mesma (Organização Mundial de Saúde/ 2005; ADPD/ Portal da Diabetes 2014).



Figura 7- Imagem demonstrativa da administração de insulina por via subcutânea, retirado do Portal da Diabetes (ADPD/ Portal da Diabetes 2014).

A insulina recentemente utilizada é recombinante, sendo que existem vários tipos de insulina consoante o seu modo de ação/tempo de ação: insulina de ação rápida, insulina regular ou de ação curta, insulina de ação intermédia e insulina de ação lenta (Koda-Kimble 2009; Silva et al. 2003). A escolha do tipo de insulina é feita de acordo com o tipo de diabetes e o doente em si.

Até os dias de hoje, a única via de administração de insulina é a via s.c. que está bastante estudada e a sua eficácia comprovada. Existem várias desvantagens nesta via de administração que levam a uma procura de novas vias alternativas. A Tabela 1 faz a síntese dos principais problemas associados à insulino-terapia atual.

Tabela 1- Desvantagens associadas à administração contínua de insulina por via s.c.

Desvantagens da administração s.c. de insulina	
1.	Efeitos secundários de lipoatrofia e lipo-hipertrofia nos locais de injeção, agravados pelo desconforto causado aos doentes (Elsayed 2012).
2.	As constantes injeções ao longo do dia não são práticas nem cómodas para o diabético (Correia 2014).
3.	Todos os tecidos são expostos a uma concentração igual de insulina (Sharma et al. 2015).
4.	A insulina chega aos músculos e adipócitos sem antes ter sido monitorada pelo fígado (Figura 8).
5.	Apenas 20% da insulina alcança o fígado (Reis 2008).
6.	Hiperinsulinémia periférica pode causar superestimulação indesejável das respostas metabólicas (Silva et al. 2003; Ravi Kumar 2000; Chari 2014; Elsayed 2012).

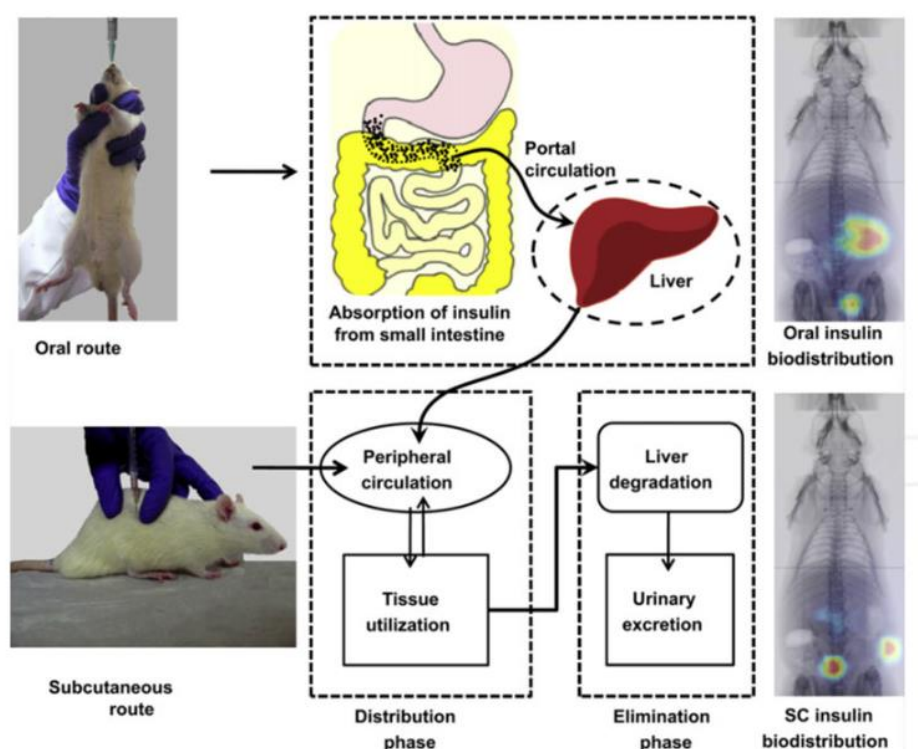


Figura 8 - Esquema ilustrativo da absorção, distribuição e eliminação da insulina administrada por via oral e s.c.: O esquema demonstra que a quantidade de insulina que chega à circulação hepática é muito superior quando utilizada a via oral, e isso é possível verificar pois a insulina foi marcada e detetada por meio visual. No caso da via s.c., a distribuição é uniforme para todos os tecidos, havendo maior eliminação por via urinária da mesma, retirado de Elçioğlu & Sezer (Elçioğlu & Sezer 2014).

1.3. A Nanomedicina no tratamento da Diabetes

A intensa procura de uma alternativa ao tratamento clássico de insulinoterapia s.c. seguiu vários caminhos, sendo que a maioria das tentativas optou pela utilização de sistemas de veiculação nanométricos. As nanopartículas são definidas como partículas sólidas com uma dimensão compreendida entre 1 e 999 nanómetros e que permitem a encapsulação de fármacos, funcionando como veículos para a sua administração (Ravi Kumar 2000). Cada vez mais são utilizadas estas nano-estruturas para uso potencial na medicina. Existem vários tipos de nanossistemas, sendo os principais: poliméricas, lipídicas, nanoemulsões, nanopartículas metálicas, dendrímeros, nanopartículas cerâmicas, quantum dots, entre outros. No presente trabalho, encontram-se referidas, apenas, as nanopartículas à base de polímeros.

1.3.1 Nanopartículas Poliméricas

As nanopartículas poliméricas (NPs) são sistemas coloidais compostos por polímeros naturais, sintéticos ou semi-sintéticos. Estes sistemas poliméricos são amplamente utilizados para a libertação de fármacos, uma vez que para além de permitirem realizar a libertação dos mesmos de uma forma controlada, também os direccionam de forma a atingir o alvo de tratamento evitando muitos efeitos secundários (Delgado 2013). As NPs poliméricas podem ser de dois tipos, nanoesferas em que o fármaco se encontra disperso numa matriz polimérica, e nanocápsulas, onde o fármaco a encapsular se encontra num núcleo líquido, rodeado por uma membrana de origem polimérica, ou adsorvido à superfície da nanocápsula (Figura 8) (C. P. Reis et al. 2006; Reis 2007; Schaffazick et al. 2003).

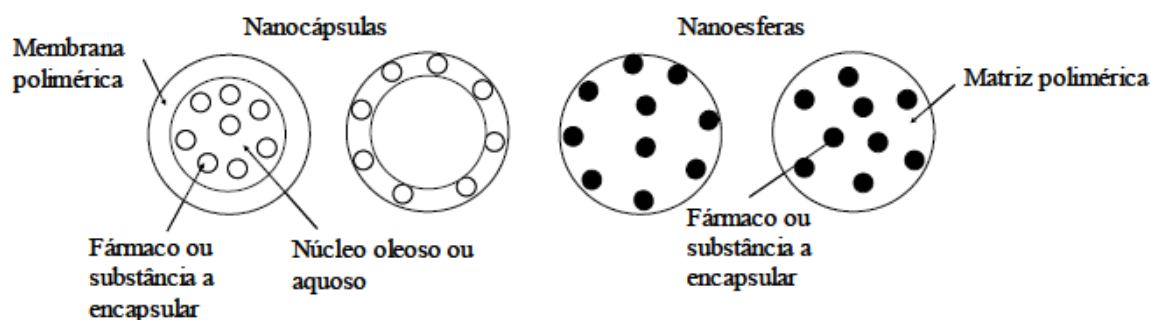


Figura 9- Esquema ilustrativo dos dois tipos de NPs, retirado de C. Reis (Reis 2007).

As NPs poliméricas têm vindo a atrair cada vez mais atenção devido às suas vantagens em relação a outros sistemas de veiculação. As principais vantagens destes sistemas, para além da libertação controlada do fármaco e terapia direcionada, são a capacidade de modificar as propriedades físico-químicas dos compostos e protegê-los de processos de degradação e interação indesejados. Tal facto permite a administração de fármacos por vias que não seriam possíveis devido a problemas de solubilidade, estabilidade e características organoléticas do próprio fármaco. O tamanho reduzido das partículas é também uma vantagem pois permite alcançar vários alvos difíceis de alcançar. Contudo existem também desvantagens como o seu reduzido tamanho que pode levar o fármaco e /ou polímero a locais indesejados provocando toxicidade, como por exemplo, a passagem pela BHE (Franco 2013) ou o próprio polímero após inúmeras administrações sofrer uma acumulação no organismo (Delgado 2013).

Para que todas as características das nanopartículas poliméricas possam ser uma vantagem, é necessário ter em conta alguns fatores na composição da NP que poderão ter influência, tais como: a composição do polímero (hidrofobicidade, carga elétrica à superfície e perfil de biodegradação); a natureza dos adjuvantes e o próprio fármaco (C. P. Reis et al. 2006). Tendo em conta as características físico-químicas do fármaco, é possível escolher o melhor método de preparação e o melhor polímero (Dias 2013; Reis 2007).

1.3.2 Nanopartículas como sistema de veiculação de insulina

As NPs vieram possibilitar a administração de vários fármacos, como é o caso da insulina, que devido à sua natureza proteica, tem baixa estabilidade e resistência enzimática. Devido a essas características, até hoje, a insulina apenas é administrada por s.c. (Silva et al. 2003; Dias 2013; Chari 2014). As vias de administração alternativas estudadas são diversas (Tabela 2), por exemplo, existem estudos realizados em animais, onde se testou a via de administração ocular por ser extensamente vascularizada (Lassmann-Vague & Raccach 2006; Patel et al. 2012). Contudo existe o problema da toxicidade do polímero utilizado e a baixa absorção (Elçioğlu & Sezer 2014). Também a via retal e vaginal foram estudadas, mas devido à espessura da mucosa destes tecidos, a taxa de absorção e biodisponibilidade são fracas (Lassmann-Vague & Raccach 2006). Vários promotores de absorção já foram estudados, mas não foi possível evitar reações locais com complicações graves (Elçioğlu & Sezer 2014; Lassmann-Vague & Raccach 2006). A

via nasal é outra via vastamente estudada uma vez que conduziu a uma rápida absorção devido à sua elevada área de superfície vascularizada, evitar o efeito de primeira passagem hepático, e possibilitar uma administração simples em forma de gotas, aerossóis ou gel (Lassmann-Vague & Raccach 2006; Elçioğlu & Sezer 2014). No entanto, também aqui a atividade mucociliar e a ação das enzimas proteolíticas dificultam esta administração. Além disso, condições fisiopatológicas associadas tais como gripe e constipações podem alterar o ambiente da cavidade nasal (Elçioğlu & Sezer 2014; Correia 2014). A administração pulmonar é uma outra via promissora, tendo sido aprovado um sistema de administração de insulina (Lassmann-Vague & Raccach 2006; Elçioğlu & Sezer 2014; Correia 2014). Foi em 2006 que foi aprovado pela FDA o primeiro sistema designado por Exubera[®], mas devido a sua baixa aceitabilidade e efeitos secundários, foi retirado do mercado um ano depois. Mais tarde, em 2014 foi aprovada, também pela FDA, a Afrezza[®] (Correia 2014). A administração bucal e sublingual de insulina tem proporcionado melhores resultados devido aos baixos níveis de atividade enzimática, alta vascularização, grande área de absorção e facilidade de administração (Kumria & Goomber 2011). No entanto, as várias camadas de células epiteliais orais e o fluxo contínuo de saliva representam uma barreira significativa à penetração do fármaco levando a uma fraca eficácia (Elçioğlu & Sezer 2014; Lassmann-Vague & Raccach 2006).

Apesar de todos os estudos realizados nas várias vias alternativas, o maior interesse ao longo dos anos tem recaído sobre a via oral pois é considerada uma via mais segura, cómoda e conveniente para o doente (Fadista 2011; Dias 2013). Para além disso, esta é a via que mais se aproxima da produção de insulina endógena, uma vez que direciona o fármaco para o fígado (Elçioğlu & Sezer 2014). Apesar de todas as vantagens associadas a esta via de administração, existem vários obstáculos a ser ultrapassados como a degradação enzimática no TGI, a fraca permeabilidade da insulina, e a sua instabilidade química e física, próprias da sua natureza proteica (Silva et al. 2003; Dias 2013; Chari 2014), daí a importância dos nanossistemas, que vêm possibilitar essa mesma administração (Elçioğlu & Sezer 2014; Fadista 2011).

Tabela 2- Vantagens e desvantagens de vias de administração de insulina alternativas. Adaptado de Kumria & Goombe (Kumria & Goomber 2011)

Via	Vantagens	Desvantagens
Oral	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Grande adesão à terapêutica ➤ Via de fácil acessibilidade 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Baixa biodisponibilidade (1%) 2. Degradação proteolítica no TGI 3. Efeito primeira passagem hepático 4. Elevada resistência oferecida pelo epitélio intestinal
Pulmonar	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Elevada permeabilidade ➤ Grande área de superfície (100-140m²) ➤ Altamente vascularizado ➤ Imunotolerância 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Biodisponibilidade de apenas 9-22% em relação à via SC 2. Variação na absorção devido à diferença de idade, infecção do tracto respiratório e tabagismo 3. Necessárias grandes quantidades de insulina em relação a outras vias 4. Vários efeitos secundários como tosse, falta de ar e boca seca
Nasal	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Grande área de absorção (~150cm²) ➤ Altamente vascularizada 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Baixa biodisponibilidade (8-15%) 2. Degradação por enzimas proteolíticas 3. Efeitos adversos como irritação nasal 4. Movimento mucociliar 5. Absorção irregular
Transdérmica	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Grande área de superfície (1-2m²) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. A pele é relativamente impermeável a grandes moléculas hidrófilas como a insulina 2. Variabilidade na absorção
Ocular	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Taxa de absorção é igualmente rápida como a via SC ➤ Não tem efeito de primeira passagem hepático 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Baixa biodisponibilidade 2. Irritação local

1.3.3. Administração oral de insulina

A primeira abordagem à microencapsulação de insulina para administração oral foi realizada em 1982 por Oppenheim e colaboradores (Silva et al. 2003). Esta formulação foi administrada oralmente a ratos e levou a uma diminuição da glicemia de 15 a 20% após 3h da administração. O processo foi lento, contudo mais pronunciado do que a redução da glicemia observada com a administração s.c. Desde então muitos avanços têm sido feitos, sendo que cada vez mais nos aproximamos de soluções eficazes e eficientes (Lakkireddy et al. 2015; Silva et al. 2003). Existem já várias formulações de insulina para via oral em fase de ensaios clínicos (Tabela 3) (Herrero et al. 2012). A dificuldade na procura de uma solução encontra-se no facto de se tratar de um fármaco proteico, e existirem várias situações críticas ao longo do TGI (Figura 11).

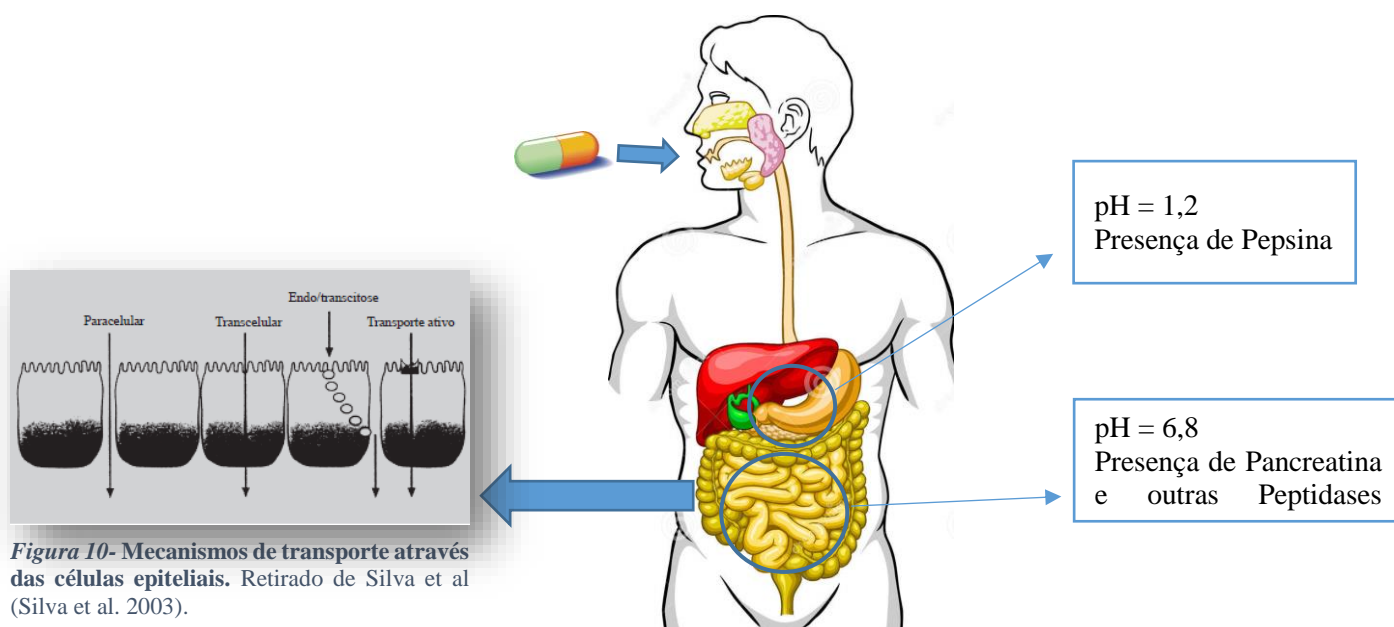


Figura 11- Esquema ilustrativo do TGI e os vários obstáculos a ultrapassar na administração oral: Os pontos críticos encontram-se no estômago onde o pH é ácido e existe uma grande quantidade de pepsina, e o intestino onde o pH é básico e estão presentes enzimas como a pancreatina.

A atividade proteolítica é talvez um dos maiores obstáculos na administração oral de fármacos peptídicos. Em indivíduos normais, 94-98% do total de proteínas são completamente digeridas e absorvidas. A proteólise tem início no estômago, na presença de pepsina, e prolonga-se no intestino delgado, por ação das enzimas proteolíticas pancreáticas e das peptidases da mucosa intestinal (Silva et al. 2003). Outro obstáculo é a fraca permeação na mucosa intestinal. Os fármacos podem passar através das células epiteliais por transporte

transcelular que inclui difusão passiva, transporte ativo ou facilitado (Figura 10) (Silva et al. 2003). Por último, temos que ter em conta a instabilidade química e física da insulina.

Com a encapsulação e veiculação da insulina, com utilização de nanossistemas espera-se uma proteção para o meio altamente ácido do estômago, degradação enzimática, prolongamento do tempo de residência no intestino, aumento da permeabilidade do fármaco, aumentando a absorção, e controlo da libertação do mesmo ao longo do tempo (Elçioğlu & Sezer 2014).

Em comparação com as micropartículas, as NPs são mais vantajosas uma vez que são mais pequenas, têm maior área de superfície de contacto e potenciam a sua absorção a nível intestinal (Damgé et al. 2008; Lopes et al. 2014; Hussain et al. 2001). As NPs podem ter vários tipos de transporte através do epitélio intestinal, tendo em conta a sua dimensão e características (Figura 10).

Tabela 3- Resumo de formulações de insulina por via oral, em ensaios clínicos. Retirado de Herrero et al. (Herrero et al. 2012)

Company	Name	Composition	Clinical development
Biocon	IN-105	Insulin-PEG (tablet)	Phase III
Oramed Pharm.	ORMD-0801	Enteric coating and absorption enhancers	Phase IIb – completed (2008)
NovoNordisk – Merion	NN1952 (INS+GIPET)	Enteric coating, medium chain fatty acids and salts	Phase I – completed (2010)
Emisphere	Eligen	Sodium <i>N</i> -[8-(2-hydroxybenzoyl) amino] caprylate	Phase I – completed (2009)
Diabetology	Capsulin	Enteric coating and absorption enhancers	Phase II
Diasome Pharmaceuticals	HDV-I	Liposomes with hepatic targeting	Phase II–III
Apollo Pharmaceuticals	Oradel	Carbohydrate – B12 nanoparticles	Phase I – competed (2007)
NodPharmaceuticals	Nodlin	Bioadhesive – enteric coated nanoparticles	Phase I
Oshadi drug administration	Oshadi oral insulin	Silica nanoparticles in enteric capsules	Phase I – completed (2011)
National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases	4 CNAB – insulin	<i>N</i> -(4-chlorosalicyloyl)-4-aminobutyrate	Phase II–III

PEG: Polyethylene glycol.

Capítulo II – Procedimiento Experimental

“New oral treatment for diabetes polymeric-based oral insulin formulation”

2.1. Objetivo do Trabalho

O objetivo do projeto de investigação foi desenvolver uma formulação para o tratamento da diabetes, administrada por via oral, recorrendo à nanotecnologia de forma a proteger a proteína ao longo do TGI.

2.2. Composição da nanopartícula

Foram preparadas NPs de PLGA revestidas com polímeros naturais como o quitosano peguilado (PEG) e albumina que se mostraram eficientes para o objetivo pretendido. Esta formulação foi baseada numa outra desenvolvida em trabalhos anteriores (Reis 2007).

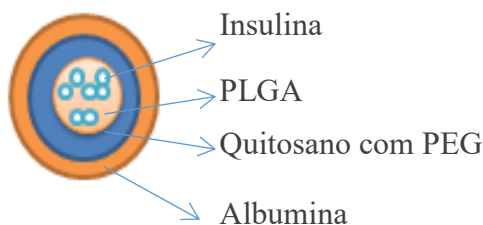


Figura 12 - Esquema demonstrativo da constituição das NPs preparadas.

a) Justificação dos polímeros utilizados

A escolha dos polímeros utilizados na produção das nanopartículas de insulina foi um ponto fulcral para o sucesso do presente trabalho. Tendo em conta a natureza do fármaco e a via de administração pretendida, assim se fez uma escolha dos polímeros com melhores características.

O primeiro polímero escolhido foi o PLGA, sendo o polímero que estaria em contacto direto com a insulina, envolvendo-a. Esta escolha teve em conta os imensos estudos já realizados sobre nanopartículas desta natureza, sendo vastamente utilizado na veiculação de fármacos (Dias 2013). O PLGA é um polímero sintético biodegradável e biocompatível, aprovado pela

FDA (Cózar-Bernal et al. 2011; Fonte et al. 2013; Sharma et al. 2015). A sua natureza hidrofóbica dificulta o aprisionamento da insulina que é hidrossolúvel, não tendo, portanto, afinidade para o polímero em questão. Contudo, o grande objetivo era utilizar um polímero para proteger a insulina mas que a liberte na sua totalidade após administração. Além disso, sendo o PLGA um polímero de carga negativa, a possibilidade de sofrer endocitose é maior, sendo degradado mais facilmente (Tahara et al. 2009). Estudos demonstram que o revestimento da nanopartícula de PLGA com um polímero policatiónico como o quitosano (CS) reverte o efeito negativo da carga do PLGA, promovendo também uma maior bioadesividade da NP à mucosa intestinal e aumento da biodisponibilidade e atividade farmacológica da insulina (Zhang et al. 2012).

O CS é um polissacárido catiónico não tóxico e é muito utilizado para permitir uma maior permeação e absorção de moléculas hidrófilas como é o caso da insulina (Elçioğlu & Sezer 2014; Reis 2007). Este polímero adere à superfície da mucosa e permite a passagem de moléculas por junções entre células epiteliais (Fonte et al. 2013; Sharma et al. 2015). Devido às propriedades mucoadesivas, o CS aumenta tempo de permanência da insulina no intestino, favorecendo a sua passagem para a corrente sanguínea (Zhang et al. 2012). Vários estudos realizados demonstram a vantagem do CS no aumento da absorção de fármacos pela via paracelular devido à disrupção transitória das junções das células (Figura 13) (Dias 2013). Yamoto et al. realizou ensaios *in vivo* utilizando como modelo animal o porquinho-da-índia, e onde foram testadas por via pulmonar, formulações na presença e ausência de CS. Os resultados demonstraram que houve um aumento do fármaco testado na presença de CS, bem como a sua concentração sanguínea, tendo um aumento de absorção de aproximadamente 10% em relação às mesmas NPs sem o revestimento de CS (Yamamoto et al. 2005; Dias 2013).

Além disso, de forma a evitar o reconhecimento, opsonização e captura precoce por parte das células fagocitárias, utilizaram-se polímeros hidrófilos à superfície, nomeadamente, o polietilenoglicol (PEG). Esta inclusão permitiu aumentar o tempo de permanência da formulação na corrente sanguínea, por alcançar níveis baixos de reconhecimento pelo sistema imunitário do hospedeiro (Dias 2013).

Por fim, procedeu-se a mais um revestimento com albumina, que é um polímero hidrófilo natural (Correia 2014). Este revestimento, realizado anteriormente e patenteado (A. C. B. Reis et al. 2006), permitiu aumentar a proteção do fármaco face à pepsina.

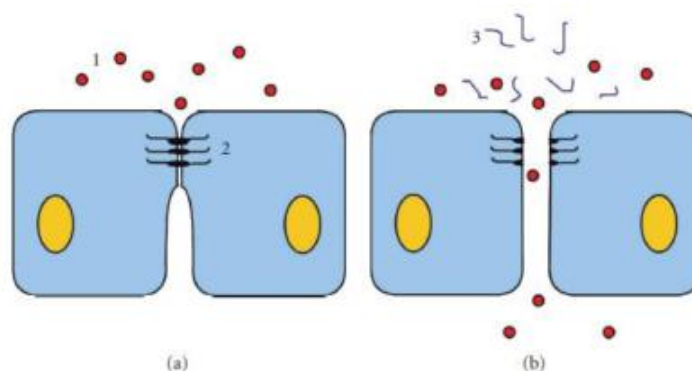


Figura 13 - Efeito do CS na absorção de fármacos pela via paracelular. (a) Epitélio normal. (b) Interrupção transitória das junções intercelulares por ação do CS. 1: Fármaco 2: Junção intercelular 3: CS. Retirado de Dias, J. (Dias 2013)

b) Justificação do método utilizado

De uma forma geral, é possível dividir os métodos de preparação de nanopartículas em duas grandes categorias: nanopartículas produzidas através da formação de reações de polimerização, e nanopartículas resultantes diretamente de uma macromolécula ou polímero natural, sintético ou semi-sintético pré-formado. O primeiro grupo pode ainda ser dividido em reações de polimerização por meios de emulsões (orgânicas ou aquosas), e reações de polimerização interfacial (C. P. Reis et al. 2006). Para além destes, existe um tipo de método de preparação de nanopartículas conhecida como tecnologia supercrítica. O método utilizado no presente trabalho foi o método de polímeros pré-formados sintéticos modificado de emulsificação espontânea por deslocamento de solvente, sendo que se encontra na segunda grande categoria. Este método permite produzir nanosferas e nanocápsulas. Este método foi o escolhido porque permite encapsular fármacos hidrossolúveis, como a insulina, em polímeros hidrofóbicos como o PLGA (Dias 2013; Reis 2007). Nesta técnica de produção de nanopartículas a fase orgânica que contém o fármaco e o polímero é incorporada na fase aquosa contendo um agente tensioativo com auxílio de agitação (Dias 2013). Este método deverá ser realizado em condições controladas e agitação constante.

c) Justificação da utilização de líquidos iónicos

Os líquidos iónicos (LIs) pertencem a uma classe de sais orgânicos com ponto de fusão abaixo de 100°C. Estes possuem na sua composição uma mistura de catiões orgânicos de baixa simetria e uma variedade de aniões orgânicos e inorgânicos (Branco 2015). Os LIs, também conhecidos como sais fundidos, fazem parte das áreas mais interessantes no presente mundo da química. O interesse nestes compostos é devido a várias características dos mesmos, como a grande estabilidade térmica, química e electroquímica, também a baixa pressão de vapor, o facto de ser possível ajustar as suas propriedades polares e hidrofóbicas, bem como a sua miscibilidade, e a possibilidade de adaptar as suas propriedades físicas. De uma forma geral, devido à sua composição, os LIs podem adquirir várias estruturas, adaptando-se ao meio em que estão envolvidos, fazendo destes uns “designers solvents” (Ferraz 2014; Branco 2015). Na área das ciências farmacêuticas, as aplicações dos LIs são diversas, tais como: o uso como solventes alternativos na síntese de alguns fármacos; em processos de extração de compostos farmacêuticos de soluções aquosas; em processos que envolvam a distribuição controlada de fármacos e entre outros (Branco 2015).

No presente trabalho, os LI foram utilizados de forma a favorecer a dissolução do PLGA. A concentração de LIs utilizada foi baseada em estudos anteriores do nosso grupo de investigação. Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que a concentração 2% não se revelou tóxica em modelos celulares.



Figura 14- Algumas das possíveis áreas e aplicações dos Lis, adaptado de Ferraz (Ferraz 2014).

2.3. Materiais

Pluronic® F68 (POLX), poli (D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), pepsina, albumina de origem bovina, quitosano e PEG foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Quanto à insulina utilizada, neste estudo foi a insulina de ação rápida Actrapid®, gentilmente fornecida pela Novo Nordisk (Lisboa, Portugal), e cuja concentração foi de 100UI/mL. Todos os produtos químicos e solventes utilizados apresentavam pureza analítica.

2.4. Métodos

2.4.1. Preparação das NPs de PLGA com insulina

As nanopartículas (NPs) foram preparadas pelo método modificado de emulsificação espontânea por deslocamento de solvente, como mostra a Figura 4 (Reis 2007). Assim sendo,

preparou-se uma solução orgânica composta por um polímero (PLGA) e o fármaco (insulina) numa mistura de solventes não aquosos miscíveis com água com e sem 2% de líquidos iônicos (LIs). Esta solução foi adicionada, gradualmente, a uma solução aquosa composta por um agente emulsivo (POLX) dissolvido em tampão acetato de pH 4,5 (USP XXX). Todo o processo decorreu à temperatura ambiente (25°C), com uma velocidade de agitação de 800 rpm, durante 15 minutos (Correia 2014). Este valor de velocidade de agitação foi baseado em estudos anteriores realizados, que demonstram que a 800 rpm se obtêm melhores índices de polidispersão, ou seja, menor agregação das partículas (Rekha & Sharma 2013). De seguida, as NPs foram revestidas com uma solução aquosa de quitosano enriquecida com PEG à temperatura ambiente com uma agitação constante de 180 rpm durante 30 minutos. Mais tarde, foi realizado um segundo revestimento, com uma solução aquosa de albumina a uma agitação de 100 rpm durante 30 minutos.

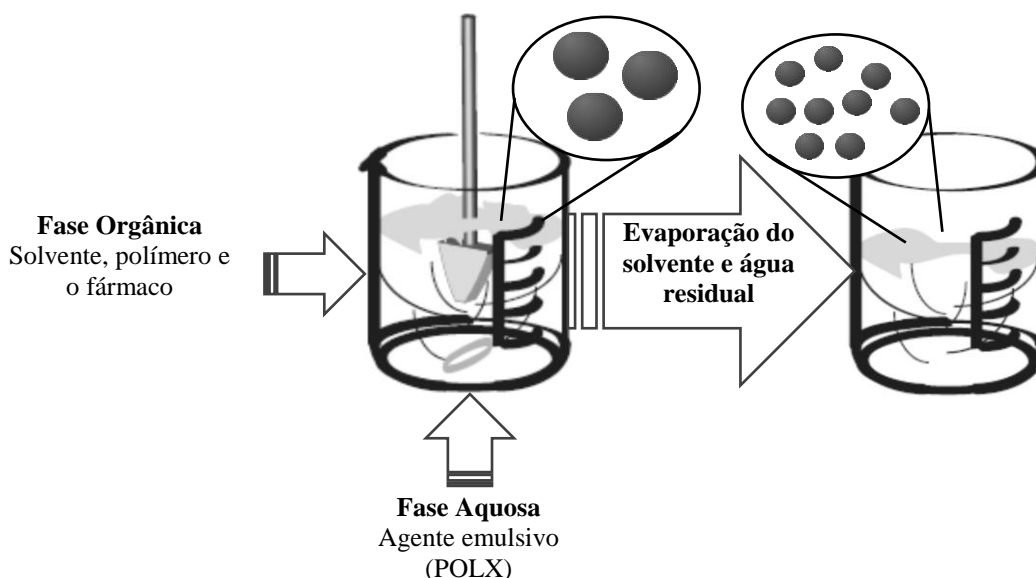


Figura 15- Preparação de NPs pelo método de emulsificação espontânea por deslocamento do solvente, adaptado de Reis C. (Reis 2007).

2.4.2. Caracterização das nanopartículas

Análise do tamanho de partícula

A média do tamanho das partículas e o índice de polidispersão (IP) das NPs foram medidos em sistemas de partículas hidratadas (soluções aquosas diluídas de 1:1) através de

espectroscopia de correlação de fótons, num analisador de partículas Coulter Nanosizer Delsa NanoTMC (Coulter Beckman, Fullerton, CA, EUA). Todas as experiências foram efetuadas à temperatura ambiente com um ângulo de deteção de 165° e em triplicado (Reis 2007).

Análise do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado com o auxílio do Delsa NanoTMC (Coulter Beckman, Fullerton, CA) através da técnica de anemometria de LASER Doppler (LDA). Este é um processo óptico que se baseia na aplicação do efeito Doppler para a determinação da velocidade de partículas contidas no meio fluido. Sendo que para o sucesso da técnica, as partículas analisadas devem ter uma densidade parecida à do meio fluido utilizado (Pinto et al. 2008). Cada análise foi realizada a 90° e em triplicado (Reis 2007; Hurkat et al. 2012).

Análise da superfície e morfologia das partículas

A morfologia foi avaliada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) antes do procedimento de centrifugação. Foi colocada uma alíquota de cada amostra numa lamela de vidro, e deixado a secar num exsiccador para posterior análise SEM. O material foi, em seguida, revestido com uma camada fina de ouro (com 500 nm de espessura) e observado através do microscópio eletrónico de varrimento da marca JEOL, modelo 5200LV (JEOL Ltd., Tóquio, Japão) a uma voltagem de 20 kV. As imagens foram gravadas digitalmente.

Eficiência de Encapsulação (EE)

A percentagem de insulina encapsulada nas NPs foi determinada de forma indireta, isto é, foi calculada a quantidade de insulina no sobrenadante após uma centrifugação ($25000 \times g$, 10 min). Esta insulina foi calculada pelo método de HPLC isocrático (Correia et al. 2014), a diferentes comprimentos de onda, 214 nm, 254nm, 260 nm e 280 nm, com um detetor UV e com uma coluna Zorbax SBCN (3,5 μ m, 150 x 4,6 mm). Como fase móvel utilizou-se uma solução aquosa de Na₂SO₄ anidro (0,2 M) ajustada a um pH de 2,3 com ácido fosfórico. A esta

solução juntou-se acetonitrilo numa proporção 73:27 v/v. O fluxo foi isocrático (0,8 mL / min). As medições foram feitas em triplicado e a curva de calibração foi feita com uma solução padrão de insulina (Prusty & Sahu 2013; Correia 2014). A gama de linearidade foi estabelecida no intervalo 2-100 µg / mL.

Os valores de EE foram calculados respeitando a seguinte equação:

$$EE \% = \frac{(Insulina\ inicial\ adicionada - Insulina\ no\ sobrenadante)}{Insulina\ inicial\ adicionada} \times 100$$

Rendimento de Recuperação

As NPs foram recuperadas após o processo de centrifugação e liofilização a -49°C durante, pelo menos, 48 h (Freezone 2.5 L, Freeze-dryer Labconco, Kansas City, MO, EUA). Em seguida, as NPs foram armazenadas a 4°C de acordo trabalhos anteriores (Reis 2007). O rendimento de recuperação foi determinado pela seguinte equação:

$$RR \% = \frac{Massa\ de\ partículas\ liofilizadas}{Massa\ inicial\ de\ sólidos} \times 100$$

2.4.3. Atividade da insulina

Por ELISA

A atividade da insulina após encapsulação foi verificada através de um ensaio de ELISA (Mercodia Insulin ELISA, Suécia). As alíquotas das amostras recolhidas durante os ensaios foram diluídas com água desionizada (Milli-Q®), sendo que a gama de concentrações foi mantida entre 1-200 mU / L que segundo o protocolo do fabricante é a gama ideal. Os valores foram obtidos por análise de Bradford. Neste ensaio utilizou-se o método de ultrassons para a libertação de insulina a partir das NPs.

Por dicroísmo circular

A estrutura secundária de insulina libertada a partir das NPs foi também analisada por dicroísmo circular (DC). Os espectros foram obtidos através de um espectropolarímetro equipado com um controlador de temperatura. A temperatura foi mantida constante a 25°C, e o comprimento de onda utilizado esteve compreendido entre 200 e 300 nm. As amostras para análise de DC (Jasco, J-815 Spectropolarimeter, Chelmsford, Reino Unido) foram obtidas após a dissolução das partículas em tampão PBS (USP XXX) e as concentrações de insulina de todas as amostras foram normalizadas para 1 mg / mL e comparadas com igual concentração de insulina não encapsulada (Hurkat et al. 2012).

2.4.4. Ensaio de libertação *in vitro* (simulação das condições TGI)

Uma quantidade de NPs foi colocada em tampão HCl/KCl de pH 1,2 (USP XXX) com e sem enzimas nas condições gastrointestinais. O ensaio foi mantido a 37°C e numa agitação constante (100 rpm), numa placa de agitação magnética com múltiplos focos (Thermo Scientific VARIOMAG Telesystem Stirrers, Langenselbold, Alemanha), durante um período de 2h. Após esse período, as NPs foram centrifugadas (12500 × g, 10 min) e o *pellet* transferido para tampão fosfato de pH 6,8 (USP XXX). O ensaio foi mantido a 37 °C e numa agitação constante (100 rpm) durante um período de 24h. Em determinados intervalos de tempo, foram recolhidas alíquotas de cada meio de libertação, realizada a medição, e reposta a alíquota novamente no meio (Reis et al. 2008). A concentração de insulina foi determinada em triplicado usando o método HPLC anterior, e respeitando a seguinte fórmula (Reis et al. 2007; Reis 2007; Prusty & Sahu 2013):

$$\text{Insulina libertada (\%)} = \frac{C_n V + V_i \sum_{i=0}^{n-1} C_i}{\text{Massa das partículas no ensaio} \times \text{Teor}} \times 100$$

2.4.5. Transporte intestinal: ensaio *ex vivo*

Transporte intestinal após administração *in situ*

Um método descrito por Barr e Riegelman (1970) foi utilizado com modificações para avaliar o transporte intestinal de fármacos. Em primeiro lugar, isolaram-se três secções do intestino delgado de um rato macho, que consistem na região do íleo, duodeno e jejuno (cerca de 5 cm cada). Depois lavaram-se as secções com uma solução de bicarbonato de Krebs-Ringer (pH 7,4, USP XXX). Ambos os lados das secções de intestino foram isolados com um fio, deixando entre eles uma mesma distância (3 cm), e com o auxílio de uma agulha hipodérmica, adicionaram-se 2 mL da solução de bicarbonato anterior e a solução contendo NPs (equivalente a 2 mg de insulina). As secções foram posteriormente colocadas num meio saturado com O₂ e CO₂ (95% O₂ e 5% de CO₂) a 37°C. Esta mistura de gases foi conseguida com a ajuda de uma bomba. Este ensaio foi realizado em triplicado para a solução de insulina comercial (não encapsulada) e a solução de NPs. Foram retiradas alíquotas do meio ao longo do tempo, de forma a estimar o teor de insulina que passa através das paredes do intestino, e determinado utilizando o método de HPLC isocrático anterior (Hurkat et al. 2012).

Estudo histológico após administração das NPs *in situ*

Antes de iniciar o ensaio *ex vivo* anteriormente descrito, e após o mesmo, foram realizados cortes histológicos do intestino, de forma a verificar se a formulação desenvolvida de NPs de insulina alterou ou não o epitélio intestinal (Malathi et al. 2015; Hurkat et al. 2012).

2.4.6. Ensaio de eficácia *in vivo*

O biotério manteve uma temperatura controlada de $22,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, uma humidade de $50,0 \pm 15,0\%$ e um ciclo diário de luz de 12h. Os animais foram mantidos com ração própria. Foi fornecido alimento e água durante todo o período experimental, com exceção do dia anterior ao tratamento (12h antes) onde se retirou a ração.

Indução da Diabetes

Para induzir quimicamente a diabetes em modelos animais, foi administrada uma injeção intraperitoneal, dose única, de uma solução extemporânea de estreptozotocina (STZ) (65 mg / kg de peso corporal) preparada em tampão citrato 0,1 M (pH 4,5, USP XXX) a ratos machos *Wistar* (2 meses de idade). Posteriormente, os animais tiveram acesso a uma solução de glucose a 5% durante toda a noite, a fim de evitar a hipoglicemia induzida pela solução de STZ administrada. Os animais foram considerados diabéticos cuja glicemia foi superior a 300 mg / dL no terceiro dia (Malathi et al. 2015; Reis 2007).

O tratamento foi iniciado no décimo dia após a indução, isto é, após a injeção de STZ, sendo que esse foi considerado o primeiro dia de tratamento (Malathi et al. 2015; Reis et al. 2007).

Determinação da glicemia

Os níveis de glicemia foram determinados pela glicose oxidase / peroxidase, utilizando um glicosímetro (OneTouch® Verio® IQ, LifeScan, Barcarena, Portugal).

Desenho Experimental

O ensaio de eficácia *in vivo* foi dividido em duas fases de estudo. Numa primeira fase, foi realizado um ensaio preliminar (n = 6), onde se dividiram aleatoriamente os animais (ratos machos *Wistar* jovens, peso compreendido entre 200-300g) em dois grupos: o grupo teste (n = 3), onde foram administradas oralmente as NPs formuladas a 50 IU/kg e o grupo controle negativo (n = 3), onde foram administradas as NPs vazias. Numa fase posterior foram utilizados três grupos: grupo teste onde foram administradas NPs de insulina a 50 UI/kg, n= 5; grupo onde foram administradas NPs de insulina com LIs, n= 4 e grupo do controle negativo com as nanopartículas vazias, n= 4. Os animais foram divididos e mantidos todos nas mesmas condições.

Análise estatística

Cada valor é apresentado com uma média \pm D.P.. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de t de Student e por ANOVA. Através destes testes foi possível comparar dois ou múltiplos grupos, respectivamente. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Prism, versão 7.02) e as diferenças foram consideradas significativas a um nível de $p < 0,05$.

Capítulo III – Resultados

3.1. Preparação das nanopartículas de PLGA com insulina

O resultado final foi uma suspensão coloidal de partículas de cor translúcida e uniforme, sendo que se mantida em repouso ocorre a deposição das NPs (Figura 16).

Todas as soluções utilizadas foram preparadas no máximo 24 h antes da sua utilização e foram armazenadas no frigorífico. As condições do laboratório foram sempre rigorosamente controladas, nomeadamente, a temperatura que não ultrapassou os 21°C e humidade de 55%.



Figura 16- Aspecto final NPs após preparação e revestimento.

3.2. Tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e morfologia

As NPs foram preparadas pelo método modificado de emulsificação espontânea por deslocamento de solvente. As NPs apresentaram uma distribuição de tamanhos unimodal, como é possível verificar na Figura 17a. O diâmetro médio das NPs foi de $613,3 \pm 76,7$ nm. Este tamanho das NPs foi inferior à dimensão crítica descrita em trabalhos anteriores para que ocorra absorção gastrointestinal pelos enterócitos e pelas células M nas placas de Peyers (Reis et al. 2007; Norris et al. 1998). O tamanho de partícula para ser absorvido pela mucosa intestinal continua a ser pouco consensual. Alguns estudos demonstram que as partículas devem ser inferiores a 5×10^3 nm para serem absorvidas a nível intestinal, outros referem 10×10^3 nm (Reis et al. 2007). Existem, ainda, estudos que demonstraram que a captação pelas células M é otimizada para partículas cujo tamanhos se encontram num intervalo de 130-950 nm e outros estudos que referem que a absorção através dos enterócitos é mais eficiente em NPs menores com diâmetros compreendidos entre < 50 e 100 nm (Pridgen et al. 2016).

Além disto, como se pode verificar na Figura 18, as NPs têm também uma forma uniforme, esférica e bem definida com ausência de aglomerados. A aparência esférica e bem

definida é característica do polímero escolhido (Reis et al. 2007). É possível verificar ainda que a adição de LIs na solubilização do PLGA à formulação não alterou nem a forma nem o tamanho das NPs.

Para além do tamanho e forma, existem outros fatores que contribuem para um aumento da absorção intestinal das partículas, tais como a hidrofobicidade, as propriedades em massa e a carga. A carga das NPs foi verificada através da medição do potencial zeta, sendo que este foi medido em todas as fases de produção. As NPs não revestidas apresentaram uma carga negativa ($-34,10 \pm 0,01\text{mV}$). Este valor foi concordante com o valor da carga do polímero utilizado, o PLGA ao pH do meio considerado (Rescignano et al. 2015; Martin-Banderas et al. 2013). Ao adicionar o revestimento de CS (polímero catiónico) com PEG, a carga inverteu para positiva ($29,51 \pm 0,01\text{mV}$). As NPs finais, após adição do revestimento de albumina, apresentaram novamente uma carga negativa, ($-14,93 \pm 0,01\text{mV}$) tal como observado em estudos anteriores (Reis et al. 2008; Schaffazick et al. 2003). Apesar de negativa, a carga foi menos negativa quando comparada com as NPs de PLGA não revestidas. Estas alterações do potencial zeta ao longo da produção das NPs, sugerem que houve um revestimento pelos diferentes materiais.

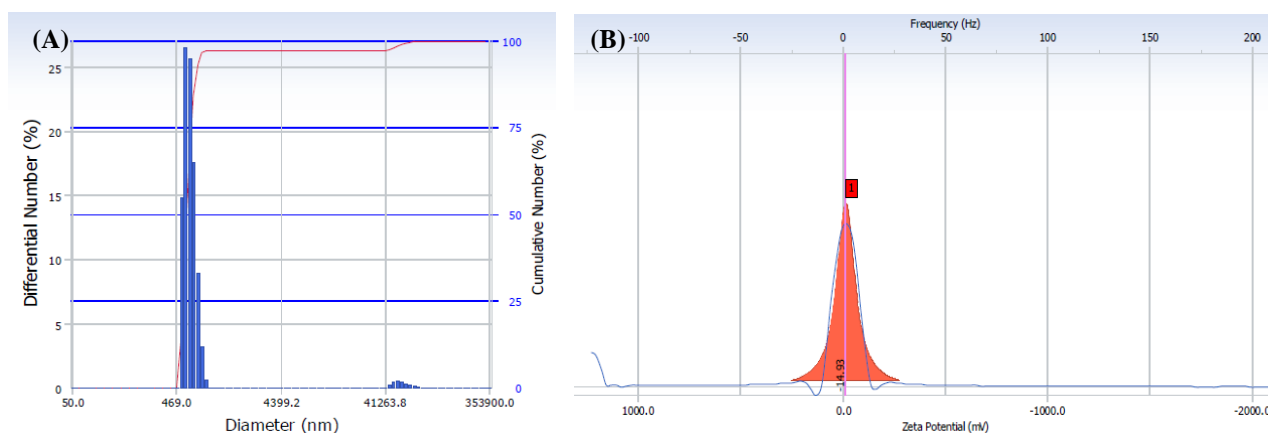


Figura 17- (A) Distribuição dos valores de diâmetro das NPs (B) Potencial zeta das NPs finais.

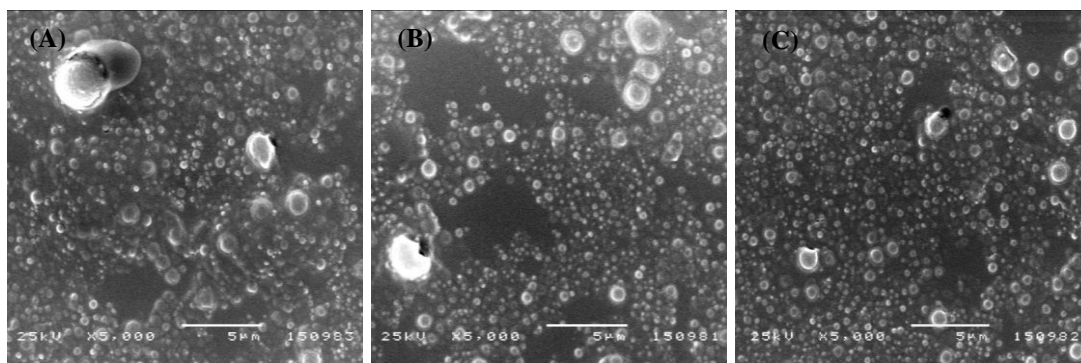


Figura 18- Imagens SEM das NPs: (A) NPs vazias; (B) NPs de insulina e (C) NPs de insulina com LIs.

3.3. Eficiência de Encapsulação (EE) da insulina nas NPs

A EE determinada foi de $59,8 \pm 2,6\%$ da insulina utilizada na formulação inicial. Seria desejável obter um valor mais elevado. Porém, durante o processo de produção das NPs existem fases que poderão ter influência na diminuição do valor da EE. Em primeiro lugar, poderá dever-se ao valor de pH que tem um efeito importante sobre a EE (Reis et al. 2007) e devido aos revestimentos e agitação usada nesses revestimentos. Uma vez que a insulina tem um ponto isoelétrico (pI) de cerca de 5,3 e a albumina tem valores de pI de 5,2 (num meio a pH de 4,5), ambas as proteínas estão carregadas positivamente, algumas interações adicionais entre todas as espécies envolvidas, nomeadamente, a albumina, o CS, insulina e o PLGA, promovem a difusão da insulina encapsulada (Norris et al. 1998; Malathi et al. 2015). Além disso, a agitação durante os processos de revestimento poderão conduzir a uma difusão da insulina encapsulada. A insulina tem uma maior afinidade para a fase externa (aquosa) e, portanto, tem tendência a difundir para fora da matriz polimérica.

3.4. Rendimento de Recuperação (RR) do processo de preparação NPs

O rendimento de recuperação foi de $80,6 \pm 1,1\%$. Este bom resultado terá naturalmente um forte impacto ao nível da escala industrial.

3.5. Atividade da insulina após encapsulação nas NPs

No ensaio de atividade por ELISA foi avaliada atividade da insulina não encapsulada, insulina encapsulada e libertada, insulina encapsulada e libertada após a passagem por meio ácido (pH = 1,2) e meio básico (pH = 6,8) com e sem enzimas, simulando o suco gástrico e o intestinal. Em todos os casos, a insulina manteve-se bioativa uma vez que todas as amostras apresentaram coloração amarela, sugestiva da manutenção da atividade da insulina e reacção anticorpo-antigene.

A preservação da integridade estrutural de fármacos proteicos é essencial para a eficácia biológica. Assim sendo, a estrutura secundária da insulina libertada a partir das NPs foi analisada por dicroísmo circular (DC). Observou-se que a estrutura secundária da insulina permaneceu inalterada, sendo possível com isto concluir que a insulina não perdeu a sua estrutura secundária nem desnatura após o processo de encapsulação com ou sem LIs (Figura 19). Na Figura 19 é possível observar duas bandas características no espectro de DC da insulina, que se encontram a $207,5 \pm 0,3$ nm e $222,5 \pm 0,1$ nm. Os espectros sobrepõem-se, suportando os resultados anteriores da manutenção da atividade da insulina após todas as fases de produção das NPs. Como já é conhecido, a insulina apresenta uma estrutura secundária em alfa-hélice que é responsável pela sua atividade (Hurkat et al. 2012).

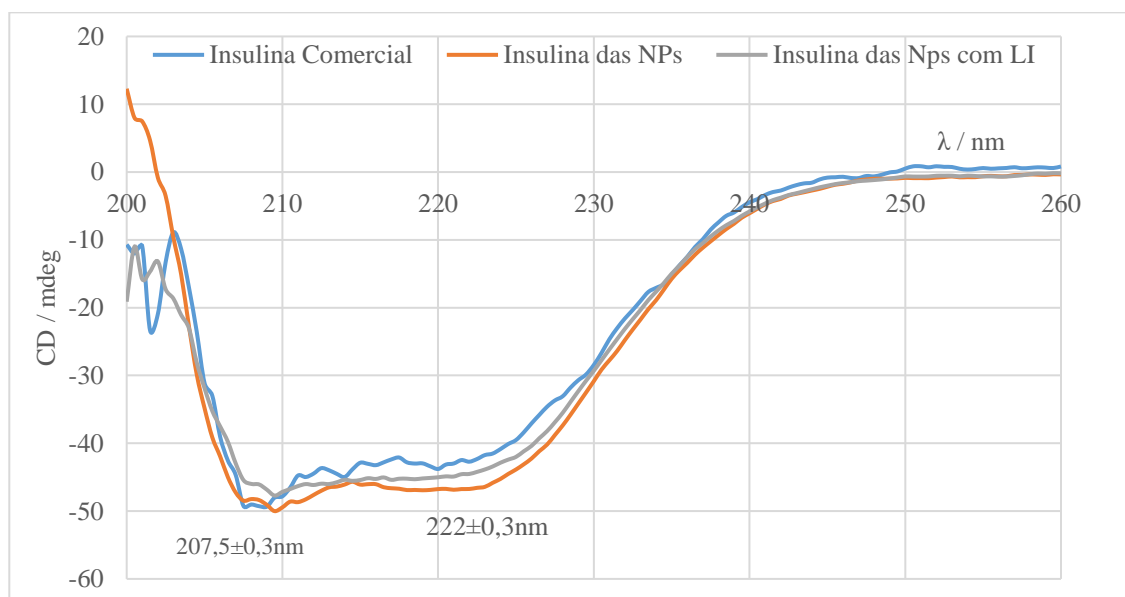


Figura 19- Espectro de DC da Insulina Comercial (Actrapid 100 UI/mL); Insulina das NPs; Insulina das NPs com LIs.

3.6. Ensaio de libertação *in vitro* da insulina

Este ensaio foi realizado de forma a conhecer o perfil de libertação da insulina no TGI. Para tal, simularam-se as condições e meios do estômago e do intestino, na presença e ausência de enzimas. A temperatura foi mantida nos 37° C e a agitação foi constante. Numa primeira fase colocou-se as NPs no meio ácido (correspondente ao estômago) e fez-se recolhas até 2 horas. Os resultados foram obtidos através da leitura da absorvância no espectrofotómetro não foram conclusivos. No meio com ausência de enzimas, a percentagem de libertação da insulina manteve-se constante, com cerca de $22,6 \pm 0,37\%$. Na segunda fase, a insulina começou a libertar-se após 1 hora de ensaio, e libertou-se a 100% ao final de 1 hora e meia. Na presença de enzimas, os dados foram inconclusivos. O estudo do ensaio *in vitro* deverá ser repetido, e idealmente deverá ser utilizado um método analítico mais sensível, como por exemplo, HPLC. Ao comprimento de onda utilizado, todas as proteínas absorvem, tal como a albumina que também está presente na formulação, e as enzimas utilizadas como é o caso da pepsina (Berde et al. 1999; Schmid 2001; Robert et al. 1951; Coulter & Stone 1936). O pico de absorvância é aproximadamente 280 nm para a insulina e da albumina (Berde et al. 1999).

Seria expectável que a insulina não fosse libertada das NPs a meio ácido com ou sem presença de enzimas, e que só no meio correspondente ao intestino, a um pH de 6,8 na presença de pancreatina ocorresse a libertação da mesma, onde iria ser absorvida para a corrente sanguínea através do epitélio intestinal (Sarmiento et al. 2006; Hosseiniinasab & Pashaei-asl 2014). Contudo, num estudo já realizado com NPs de alginato revestidas com quitosano e albumina, verificou-se igualmente uma libertação de insulina das NPs de cerca de 25% num meio ácido (pH 1,2) (Reis 2007). Neste último estudo, o autor optou igualmente para HPLC, conseguindo resultados sem interferências, ao contrário do sucedido neste trabalho.

3.7. Transporte intestinal: ensaio *ex vivo*

Após a análise histológica do epitélio intestinal, verificou-se que a formulação utilizada não alterou o epitélio intestinal, sugerindo que os compostos utilizados são biocompatíveis corroborando estudos anteriores (Cózar-Bernal et al. 2011; Fonte et al. 2013; Rodrigues et al. 2012; Sharma et al. 2015).

3.8. Ensaio de eficácia *in vivo*

O objetivo do presente trabalho de investigação, tal como foi referido inicialmente nesta dissertação, é encontrar uma alternativa de tratamento para a DM tipo 1 ou tipo 2 com necessidade de insulino terapia. Assim sendo, o pretendido é avaliar se a formulação desenvolvida demonstra ou não alguma eficácia quando administrada oralmente, através da redução do valor da glicémia. Foram realizados dois estudos em separado e em ambos os estudos, foi possível observar a eficácia da formulação. No ensaio *in vivo* preliminar, onde se comparou dois grupos (grupo teste e controlo negativo) verificou-se que a glicémia dos ratos tratados com as NPs de insulina diminuiu significativamente, quando comparado com o grupo do controlo negativo onde foi administrado oralmente NPs vazias. Após 4 h, a redução da glicémia foi superior a 50%. Após 5 h, o ensaio foi obrigatoriamente interrompido porque os ratos entraram em hipoglicémia e foi administrada glucose oral (Figura 20). Os animais em estudo retomaram os seus valores de glicemia após 7 h.

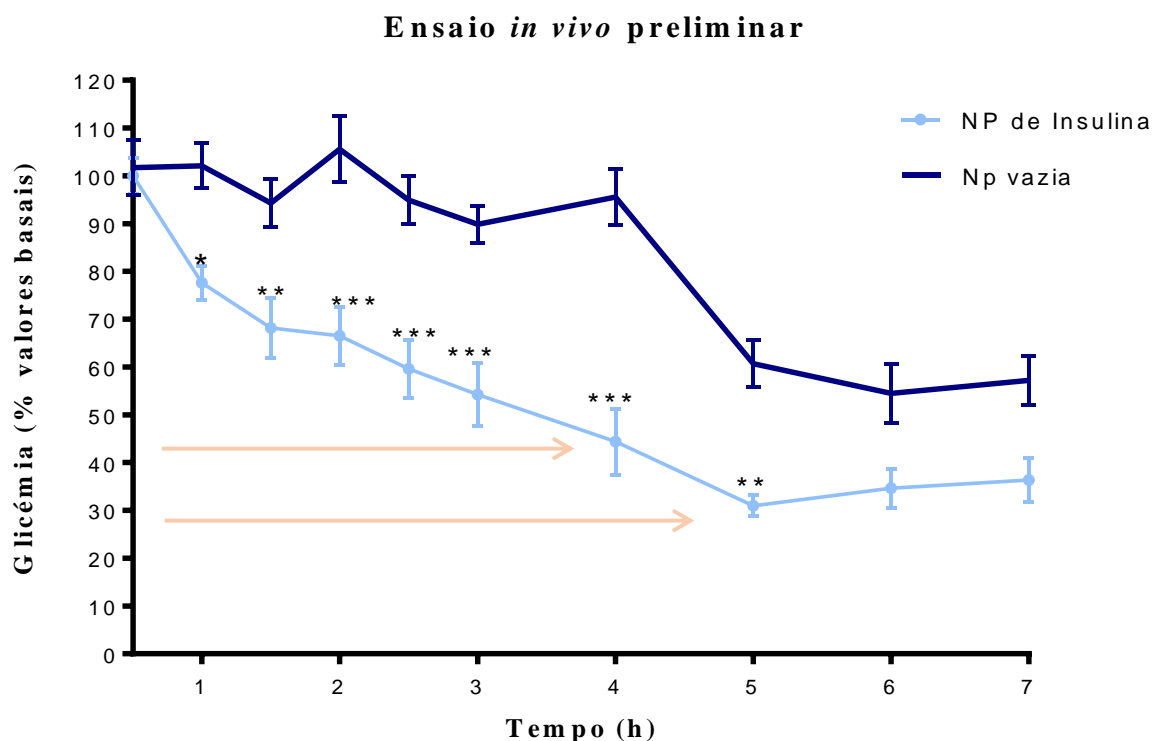


Figura 20 – Influência na glicémia das formulações administradas oralmente a ratos diabéticos (n = 6) ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

No segundo ensaio *in vivo* realizado, observou-se uma redução de cerca de 50% do valor da glicemia mas após 5 h nos grupos teste. Os LIs não alteraram o perfil do glicémico (Figura 21). Como se pode verificar pelo gráfico, não existem diferenças estatisticamente significativas a um nível de confiança de $P < 0,05$, entre as NPs de insulina com e sem LI. Contudo verifica-se uma grande diferença na utilização de Nps de insulina e Nps vazias, confirmando assim a eficácia da formulação.

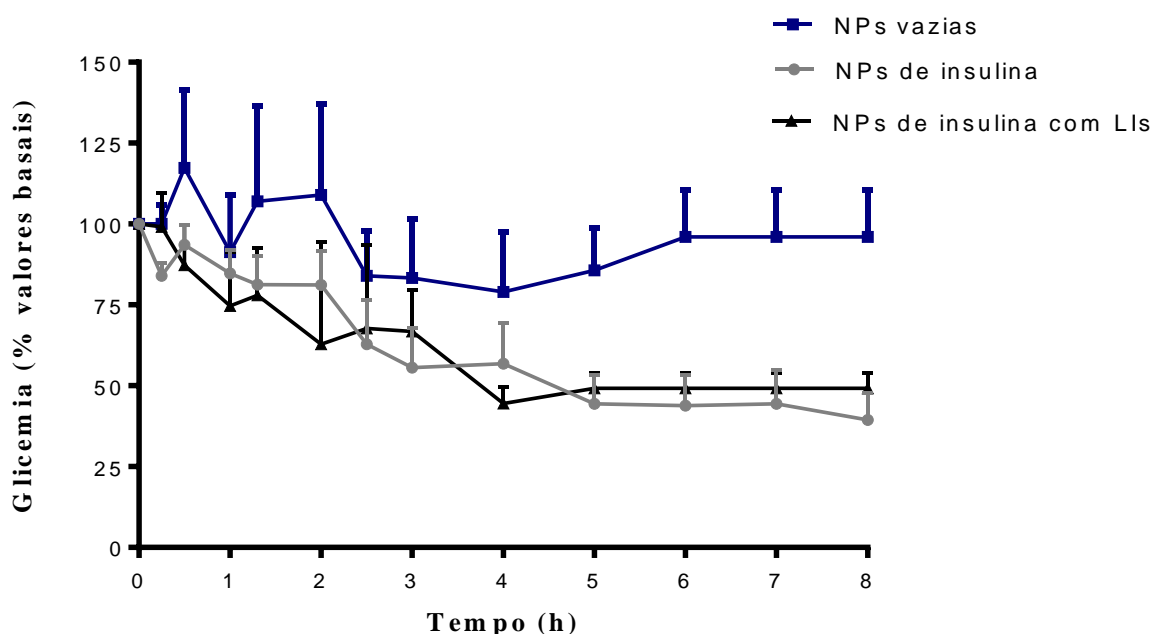


Figura 21 – Influência na glicemia das formulações administradas oralmente a ratos diabéticos (n = 6) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Num estudo anterior em ratos *Wistar* diabéticos, em que se comparou a administração s.c. de insulina a 4 UI/kg, com a administração oral de NPs de insulina a 50 UI/kg, revestidas com CS e albumina, demonstrou que a formulação de NPs conduziu a uma redução de 28% da glicemia entre a 2ª e 4ª hora, e mais tarde uma redução de 48% entre 8ª e 12ª hora (Reis 2007). O presente trabalho demonstrou um efeito mais rápido logo após 4 horas.

Capítulo IV – Conclusão

A administração da insulina por via oral é um tema cada vez mais estudado e investigado, não só para procurar melhorar a qualidade de vida dos diabéticos, como também evitar alguns problemas associados à administração de insulina por via s.c.

Muitas tentativas têm sido realizadas e várias vias de administração testadas com sucessos muito discretos.

Como descrito durante esta dissertação, as NPs desenvolvidas demonstraram ser eficazes, eficientes e inócuas para o organismo. Os resultados são bastante positivos e promissores. A encapsulação foi bem sucedida, tendo obtido uma EE de $59,8 \pm 2,6\%$, e o método utilizado não alterou a estrutura secundária da insulina, o que foi possível constatar através do estudo de DC e ensaio ELISA. Para além disso, verificou-se que a encapsulação e posteriores revestimentos protegeram a insulina e que a mesma teve atividade, sendo eficaz na redução da glicémia. Estes resultados foram concluídos através do estudo *in vivo* que veio demonstrar a potencialidade da formulação que permitiu reduzir a glicémia em ratos *Wistar* em mais de 50% passadas apenas 4 horas (Tabela 4).

Este trabalho ainda se encontra numa fase muito inicial. A nosso conhecimento, este projeto é igualmente inovador por utilizar pela primeira vez LIs na solubilização do PLGA.

Mais estudos serão realizados e mais resultados surgirão. São resultados assim que permitem acreditar na possibilidade de redução das administrações s.c. de insulina, através da administração da mesma por via oral numa cápsula ou comprimido.

Estamos, a partir de hoje, a um passo mais perto...

Tabela 4 - Resultados do sucesso e insucesso alcançados com a produção das NPs de insulina

	Sucessos	Insucessos
NPs de Insulina	Aspecto da suspensão de partículas como esperado, translúcida e sem acumulação de PLGA às paredes do copo de precipitação.	Dificuldade na produção de NPs e sua repetibilidade. Transposição à escala industrial em curso.
	Tamanho das partículas foi o ideal para a absorção intestinal.	Desconhecimento do perfil de libertação <i>in vitro</i> que demonstra uma falha na proteção de insulina, sendo esta degradada no meio ácido do estômago. Resultado contrariado pelo sucesso do ensaio <i>in vivo</i> .
	As partículas apresentaram uma morfologia uniforme, esférica e bem definida.	
	Eficiente encapsulação e posteriores revestimentos.	
	Estabilidade da insulina encapsulada comprovada e bioatividade mantida.	
	Formulação não danificou os tecidos intestinais.	
	Eficácia da formulação de insulina oral comprovada no modelo de animal rato <i>Wistar</i> .	

Capítulo V – Prespetivas Futuras

Muitas etapas foram alcançadas, contudo, ainda muitos ensaios estão por realizar. É essencial realizar mais estudos *in vitro* para conhecer corretamente o perfil de liberação da insulina encapsulada e um novo estudo *in vivo* aumentando o número de animais em estudo de forma a ter maior significância estatística. É, ainda, necessário fazer estudos toxicológicos e de estabilidade a longo prazo.

Numa fase mais avançada, estas NPs serão liofilizadas e administradas em forma de cápsula gastrorresistente e deverão ser realizados todos os estudos de estabilidade, segurança e eficácia.

Capítulo VI – Referências Bibliográficas

- ADPD/ Portal da Diabetes, 2014. Portal da Diabetes. Available at: about:reader?url=http%3A%2F%2Fwww.apdp.pt%2Fa-diabetes%2Ftratamento%2Fmedicacao.
- Alberti, K. et al., 2011. Definição, Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. *Sociedade Portuguesa de Diabetologia*. Available at: <http://www.spd.pt/index.php/grupos-de-estudo-mainmenu-30/classificacao-da-diabetes-mellitus-mainmenu-175> [Acedido Agosto 22, 2016].
- Berde, C. et al., 1999. Human Serum Albumin - Spectroscopic Studies of Binding and Proximity Relationships for Fatty Acids and Bilirubin. *The Journal of Biological Chemistry*, 77(2), pp.141–146.
- Branco, L.C., 2015. Líquidos Iónicos: Aplicações e Perspectivas Futuras. *QUÍMICA* 139, 5.
- Chari, S.T., 2014. Mechanism(s) of Pancreatic Cancer-induced Diabetes. *Journal of the Pancreas*, 15(5), p.8577. Available at: <http://www.serena.unina.it/index.php/jop>.
- Chhabra, N., 2012. Insulin Biosynthesis, Secretion, and Action. *Biochemistry For Medics*. Available at: <http://www.namrata.co/insulin-biosynthesis-secretion-and-action/> [Acedido Setembro 15, 2016].
- Correia, C. et al., 2014. Optimization of the encapsulation efficiency of a novel oral insulin delivery nanosystem. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 11. Available at: <http://www.biomedicalandbiopharmaceuticalresearch.com>.
- Correia, C.J., 2014. *Nanopartículas de insulina para administração oral*. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- Coulter, B.Y.C.B. & Stone, F.M., 1936. Spectra of Certain Proteins and. *Medicine*, (2), pp.739–752.
- Cózar-Bernal, M.J. et al., 2011. Insulin-loaded PLGA microparticles: flow focusing *versus* double emulsion/solvent evaporation. *Journal of Microencapsulation*, 28(5), pp.430–441. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02652048.2011.576786>.
- Damgé, C., Reis, C.P. & Maincent, P., 2008. Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin. *Expert opinion on drug delivery*, 5(1), pp.45–68.
- Delgado, J.M.F., 2013. *Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa*. Instituto Politécnico de Bragança. Available at: <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/9219>.
- Dias, J.A.C., 2013. *Nanopartículas poliméricas com aplicação na administração pulmonar de*

- proteínas*. Universidade do Algarve.
- Direção-Geral da Saúde, 2011. Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. *Norma da Direção Geral da Saúde (002/2011)*, pp.1–13.
- Direção-Geral da Saúde, 2013. Diagnóstico e conduta na Diabetes Gestacional. *Norma Da Direção - Geral Da Saúde*, 1(1), p.9. Available at: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i018596.pdf>.
- Elçioglu, H.K. & Sezer, A.D., 2014. Nanoparticle Insulin Drug Delivery — Applications and New Aspects. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, pp.953–978. Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/58538>.
- Elsayed, A., 2012. Oral delivery of insulin: Novel Approaches. *Recent advances in Novel Drug Carrier Systems*, pp.281–314. Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/52265>.
- Fadista, A.F. dos S., 2011. *Insulinoterapia: vias e sistemas de administração alternativos*. Universidade do Algarve.
- Ferraz, R., 2014. Líquidos Iónicos. *ScientificUs*. Available at: <https://about:reader?url=https%253A%252F%252Fscientificusblogpt.wordpress.com%25https://scientificusblogpt.wordpress.com/2014/02/19/liquidos-ionicos/> [Acedido Agosto 19, 2016].
- Fonte, P. et al., 2013. Oral Insulin Delivery: How Far are We? *Journal of Diabetes Science and Technology*, 7(2), pp.520–531. Available at: <http://dst.sagepub.com/content/7/2/520.abstract>.
- Franco, N., 2013. *Nanopartículas e a sua Aplicação em Ciências Farmacêuticas*. Universidade Fernando Pessoa.
- Goulão, I., 2007. Insulina - Estrutura, Produção e Secreção. Em *Actas Bioq. VII Seminário*. pp. 65–78.
- Graeme, I. & Kenneth, S.P., 2001. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in bold beta-cell function. *Nature*. Available at: <https://about:reader?url=http%253A%252F%252Fwww.nature.com%252Fnature%252Fjournal%252Fv414%252Fn6865%25http://www.nature.com/nature/journal/v414/n6865/full/414788a.html> [Acedido Setembro 15, 2016].
- Herrero, E., Alonso, M.J. & Csaba, N., 2012. Polymer-based oral peptide nanomedicines. *Therapeutic Delivery*, pp.657–668.
- Hosseininasab, S. & Pashaei-asl, R., 2014. Synthesis , Characterization , and In vitro Studies of PLGA-PEG Nanoparticles for Oral Insulin Delivery Synthesis , Characterization , and In

- vitro Studies of PLGA – PEG Nanoparticles for Oral Insulin Delivery. *Chemical Biology and Drug Design*.
- Hurkat, P. et al., 2012. Concanavalin a conjugated biodegradable nanoparticles for oral insulin delivery. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(11).
- Hussain, N., Jaitley, V. & Florence, A.T., 2001. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(1–2), pp.107–142.
- IDF, 2013. *IDF Diabetes Atlas - Sixth Edition*, Available at: www.idf.org/diabetesatlas.
- Infarmed, 2016. A Diabetes Mellitus em Portugal : Relevância da Terapêutica Farmacológica Adequada. *Revista Portuguesa de Farmacoterapia*, pp.44–53.
- Koda-Kimble, M.A., 2009. *Applied therapeutics : the clinical use of drugs*, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Kumria, R. & Goomber, G., 2011. Emerging trends in insulin delivery : Buccal route manifest as a part of the diabetic complications. *Journal of Diabetology*, 2(June), pp.1–9.
- Lakkireddy, H.R. et al., 2015. Oral delivery of diabetes peptides - Comparing standard formulations incorporating functional excipients and nanotechnologies in the translational context. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.02.011>.
- Lassmann-Vague, V. & Raccach, D., 2006. Alternatives routes of insulin delivery. *Diabetes & Metabolism*, 32(5), pp.513–522.
- Lopes, M.A. et al., 2014. Intestinal absorption of insulin nanoparticles: Contribution of M cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(6), pp.1139–1151. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2014.02.014>.
- Malathi, S. et al., 2015. Novel PLGA-based nanoparticles for the oral delivery of insulin Novel PLGA-based nanoparticles for the oral delivery of insulin. *International Journal of Nanomedicine*, (August 2016).
- Martin-Banderas, L. et al., 2013. Functional PLGA NPs for oral drug delivery: Recent strategies and developments. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(1), pp.58–69.
- Norris, D.A., Puri, N. & Sinko, P.J., 1998. The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34(2–3), pp.135–154.
- Organização Mundial de Saúde/, 2005. *Prevention Of Blindness From Diabetes Mellitus*, Geneva.
- Patel, A. et al., 2012. Ocular drug delivery systems: An overview. *World J Pharmacol.*, 100(2),

- pp.130–134.
- Pinto, F.T., Proença, M.F. & Maia, R., 2008. 20 Years of Experience in Laser Doppler Anemometry. Em *3.as Jornadas de Hidráulica, Recursos Hídricos e Ambiente*.
- Pridgen, E.M., Alexis, F. & Farokhzad, O.C., 2016. Polymeric Nanoparticle Drug Delivery Technologies for Oral Delivery Applications. *Expert Opin Drug Deliv.*, 12(9), pp.1459–1473.
- Prusty, A.K. & Sahu, S.K., 2013. Development and Evaluation of Insulin Incorporated Nanoparticles for Oral Administration. *ISRN Nanotechnology*, 2013, pp.1–6. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/591751/>.
- Ravi Kumar, M.N., 2000. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical sciences*, 3(2), pp.234–258.
- Reis, A.C.B. et al., 2006. Oral submicron particle delivery system for proteins and process for its production.
- Reis, A.C.B.P., 2007. *Encapsulação de fármacos peptídicos pelo método de emulsificação/gelificação interna*. Universidade de Coimbra. Available at: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/213>.
- Reis, C.P. et al., 2006. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2(2), pp.53–65.
- Reis, C.P. et al., 2008. Nanoparticulate biopolymers deliver insulin orally eliciting pharmacological response. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(12), pp.5290–5305.
- Reis, C.P. et al., 2007. Nanoparticulate delivery system for insulin: Design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(5), pp.392–397.
- Reis, C.P., 2008. Novas Alternativas Terapêuticas Para a Administração Oral da Insulina. *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*, (5), pp.174–205.
- Rekha, M.R. & Sharma, C.P., 2013. Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes-Future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*, 440(1), pp.48–62. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.03.056>.
- Rescignano, N. et al., 2015. Preparation and characterization of nickel chelating functionalized poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 468(March), pp.122–128.
- Robert, A., Saidel, L.J. & Mosovich, E., 1951. The Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins.

- Journal Biol. Chem.* Available at: <http://www.jbc.org/content/193/1/397.citation>.
- Rodrigues, S. et al., 2012. Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery. *Journal of Functional Biomaterial*, pp.615–641.
- Sarmiento, B. et al., 2006. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53(2), pp.193–202.
- Schaffazick, S.R. et al., 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, 26(5), pp.726–737.
- Schmid, F., 2001. Biological Macromolecules: Spectrophotometry Concentrations. *Encyclopedia of Life Sciences*, pp.1–4.
- Sharma, G. et al., 2015. Nanoparticle based insulin delivery system: the next generation efficient therapy for Type 1 diabetes. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), p.74. Available at: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/13/1/74>.
- Silva, C. et al., 2003. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39(1), pp.1–20.
- Sociedade Portuguesa de Diabetologia/ Observatório Nacional da Diabetes, 2014a. Diabetes Factos e Números. Em *Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes*. Lisboa.
- Sociedade Portuguesa de Diabetologia/ Observatório Nacional da Diabetes, 2014b. Diabetes Factos e Números. Em *Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes*. Lisboa.
- Subramani, K. & Pathak, S., 2012. Recent Trends in Diabetes Treatment Using Nanotechnology. *Digest Journal of Nanimaterials and Biostructures*, 7(1), pp.85–95.
- Tahara, K. et al., 2009. Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 382(1–2), pp.198–204.
- WHO, 2006. *Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia*, Available at: http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis_diabetes2006/en/index.html.
- Yamamoto, H. et al., 2005. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *Journal of Controlled Release*, 102(2), pp.373–381.
- Zhang, X. et al., 2012. Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(5), pp.632–638. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.01.002>.

Capítulo VII– Anexos

Anexo I: Curva de calibração da insulina no método de HPLC.

Tabela A1- Resultados das soluções padrão de insulina nas várias concentrações, a um comprimento de onda de 214 nm

[Insulina]/ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	tr	Área
2	6,523	101,386
4	6,465	255,500
10	6,448	633,866
20	6,472	1251,410
40	6,519	2703,200
100	6,530	6071,700

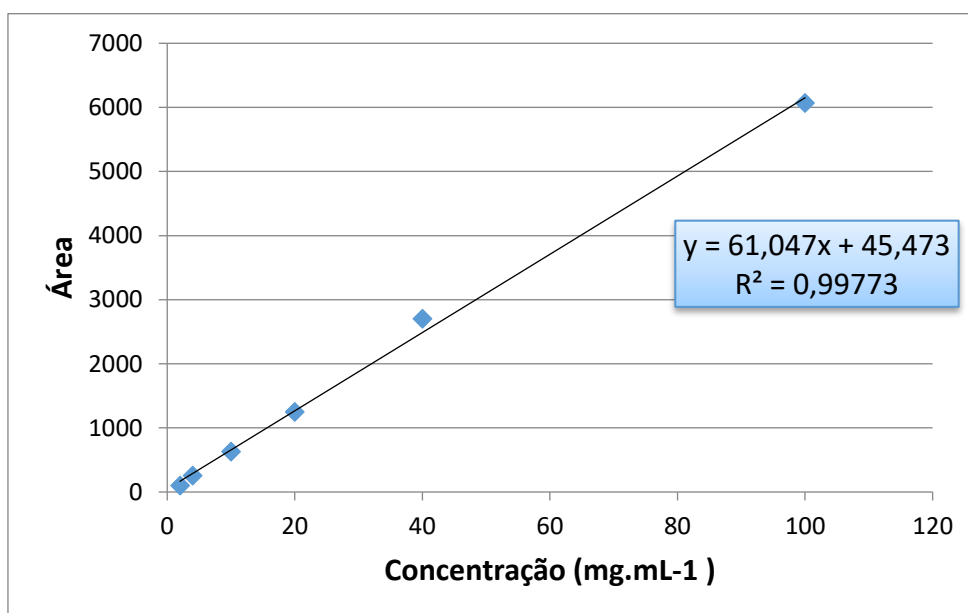


Figura A1- Curva de calibração da insulina a um comprimento de onda de 214 nm.

Tabela A2- Resultados das soluções amostra diluídas 1:20 ao comprimento de onda de 214 nm

Amostra	Tr	Área
1	5,282	2005,22
2	5,269	1085,71
3	5,296	601,83

Anexo II: Resultados quantitativos referentes ao ensaio de ELISA.

Tabela A3 - Resultados das absorvâncias das soluções padrão a um comprimento de onda de 450 nm e a sua absorvância corrigida.

Amostra	[Insulina]/ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Abs Média	Abs corrigida
0	0,0000E+00	$0,074 \pm 0,0055$	0
1	2,7392E-05	$0,078 \pm 0,0035$	0,004
2	2,7392E-04	$0,24 \pm 0,0140$	0,166
3	9,2174E-04	$0,867 \pm 0,0660$	0,793
4	1,8261E-03	$1,784 \pm 0,1170$	1,7100

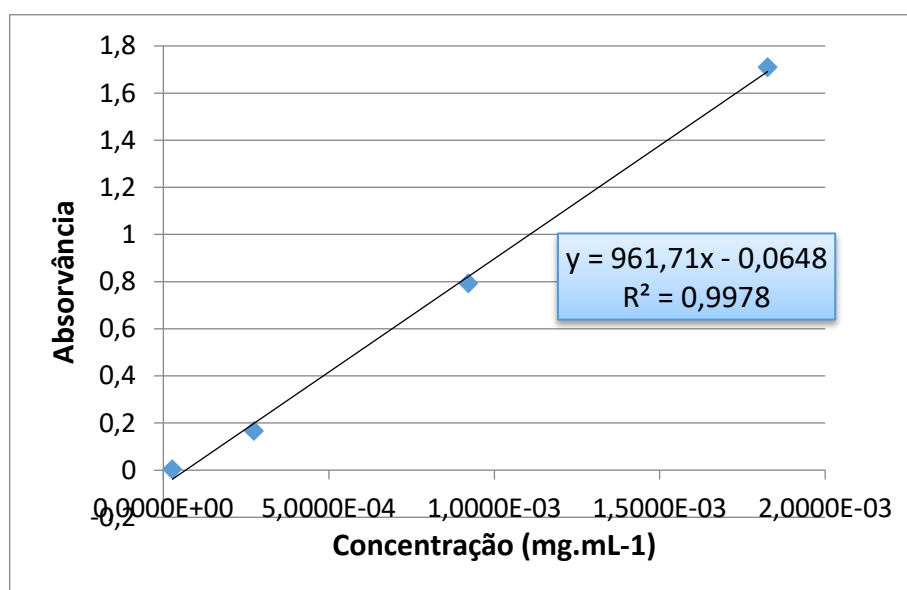


Figura A2 - Curva de calibração das soluções padrão de insulina a 450 nm.

Anexo III: Espectros de DC standard

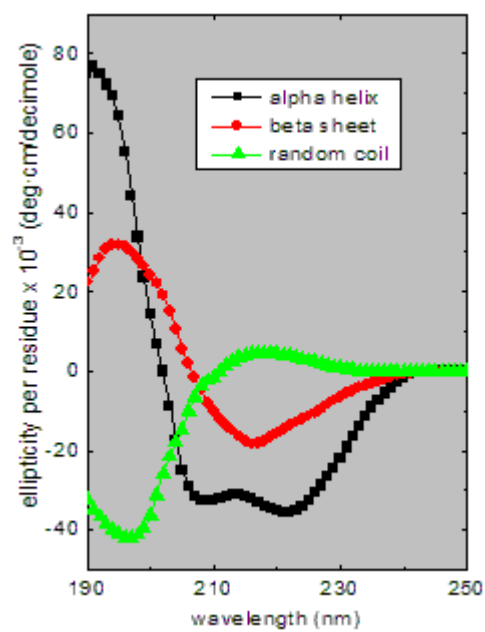


Figura A3 - Espectros de DC: O espectro a preto corresponde às proteínas de estrutura em alfa-hélice

Anexo IV: Dados do ensaio de DC no intervalo de comprimento de onda de 200 – 260 nm.

Tabela A4- Valores de DC da Insulina Comercial e Nps com e sem LIs

λ (nm)	Insulina Comercial	Nps de Insulina	Nps Insulina com LIs
260	0,8176525	-0,348249	-0,183849
259,5	0,5913725	-0,329677	-0,163787
259	0,65805	-0,422916	-0,248135
258,5	0,69857	-0,382869	-0,21737
258	0,6127625	-0,35359	-0,329007
257,5	0,5580275	-0,421983	-0,477989
257	0,711045	-0,450362	-0,581115
256,5	0,6000525	-0,622253	-0,65945
256	0,5503725	-0,622286	-0,679512
255,5	0,4845325	-0,563007	-0,636492
255	0,5893925	-0,620229	-0,644075
254,5	0,448755	-0,755747	-0,585541
254	0,3677625	-0,751339	-0,534477
253,5	0,48126	-0,780545	-0,626353
253	0,743205	-0,649966	-0,536207
252,5	0,766935	-0,738545	-0,538539
252	0,852675	-0,8106	-0,547994
251,5	0,701155	-0,905683	-0,648988
251	0,8521825	-0,891442	-0,668537
250,5	0,84156	-0,895099	-0,667813
250	0,5139975	-0,856208	-0,64552
249,5	0,08655225	-0,940786	-0,809793
249	-0,05757575	-0,967899	-0,950363
248,5	-0,39005	-0,990763	-1,08263
248	-0,638565	-0,987193	-1,17787
247,5	-0,5829025	-1,08921	-1,26595
247	-0,8904	-1,23542	-1,34174
246,5	-0,87187	-1,51229	-1,50053
246	-0,6988375	-1,72939	-1,61679
245,5	-0,7673675	-1,8733	-1,78483
245	-0,8187275	-2,16536	-2,01369
244,5	-1,094645	-2,47827	-2,25348
244	-1,568755	-2,72382	-2,5411
243,5	-1,6751675	-2,97572	-2,83045
243	-1,9331825	-3,20896	-3,12822
242,5	-2,300945	-3,47205	-3,39225
242	-2,728825	-3,97164	-3,78599
241,5	-2,948325	-4,27452	-4,1416

241	-3,382475	-4,76726	-4,6432
240,5	-4,00085	-5,40976	-5,20622
240	-4,452725	-6,0779	-5,81508
239,5	-5,166375	-6,73793	-6,45271
239	-5,964225	-7,63086	-7,2123
238,5	-6,466175	-8,41221	-7,84897
238	-7,433325	-9,30253	-8,62489
237,5	-8,5	-10,2241	-9,50673
237	-9,908475	-11,16	-10,4765
236,5	-11,053075	-12,1893	-11,3877
236	-12,4981	-13,3896	-12,538
235,5	-13,755375	-14,4859	-13,8073
235	-15,129475	-15,7389	-14,9792
234,5	-16,5093	-17,3237	-16,3506
234	-17,075975	-18,8916	-17,6388
233,5	-17,675775	-20,2227	-18,8829
233	-18,998325	-21,7396	-20,3268
232,5	-20,338075	-23,2205	-21,6966
232	-21,584475	-24,7604	-23,1145
231,5	-23,02105	-26,3747	-24,6218
231	-24,650325	-27,7559	-26,1548
230,5	-26,64975	-29,123	-27,7245
230	-28,4445	-30,8375	-29,3046
229,5	-29,85175	-32,5131	-30,7814
229	-30,70425	-34,1518	-32,3235
228,5	-31,79775	-35,8042	-33,9083
228	-33,06825	-37,3704	-35,5053
227,5	-33,68075	-38,7814	-36,8931
227	-34,60425	-40,1856	-38,2006
226,5	-35,81225	-41,155	-39,2477
226	-37,06025	-42,2417	-40,379
225,5	-38,39075	-43,1003	-41,1773
225	-39,522	-43,8668	-42,0065
224,5	-40,11075	-44,5235	-42,4121
224	-40,8605	-45,2617	-42,8701
223,5	-41,5155	-45,8315	-43,4264
223	-41,741	-46,4278	-43,8652
222,5	-42,3185	-46,5702	-44,216
222	-42,715	-46,7385	-44,5218
221,5	-42,475	-46,7492	-44,5587
221	-42,98225	-46,8507	-44,9035
220,5	-43,13775	-46,7218	-44,8773
220	-43,7875	-46,7541	-45,011

219,5	-43,3975	-46,876	-45,1066
219	-42,9615	-46,9246	-45,1848
218,5	-42,9875	-46,8806	-45,2964
218	-42,81275	-46,8995	-45,2211
217,5	-42,09925	-46,7005	-45,2224
217	-42,3745	-46,6267	-45,3906
216,5	-42,8155	-46,4725	-45,035
216	-43,22625	-46,0292	-45,258
215,5	-43,0315	-46,026	-45,148
215	-42,86825	-46,0909	-45,4149
214,5	-43,8435	-45,6729	-45,5375
214	-44,97175	-46,0808	-45,3842
213,5	-44,515	-46,3792	-45,7382
213	-43,984	-46,4948	-46,0106
212,5	-43,66675	-46,996	-45,9531
212	-44,472	-47,621	-46,1522
211,5	-44,97625	-48,2632	-46,0126
211	-44,75725	-48,6804	-46,3136
210,5	-46,53175	-48,6052	-46,7499
210	-47,82275	-49,4432	-47,1665
209,5	-48,02	-50,0027	-47,7146
209	-49,34425	-49,0793	-46,8356
208,5	-49,27425	-48,3685	-46,0683
208	-49,02325	-48,2265	-45,9899
207,5	-49,23825	-48,4557	-45,4303
207	-44,67	-47,2565	-42,9586
206,5	-42,54975	-44,9935	-39,7729
206	-39,027	-41,9173	-37,4978
205,5	-32,989	-39,1381	-35,2493
205	-31,12275	-34,8233	-31,8832
204,5	-23,571475	-29,8606	-28,1024
204	-17,034325	-22,772	-23,0567
203,5	-11,364675	-15,1233	-21,0838
203	-8,897225	-9,66058	-18,6601
202,5	-13,312825	-3,51217	-17,272
202	-20,969125	-0,809337	-13,1807
201,5	-23,33185	4,67431	-14,6796
201	-10,94325	7,46556	-15,8063
200,5	-11,99675	8,00239	-11,0084
200	-10,699725	12,2876	-19,1179

Anexo V: Curva de calibração da insulina no método espectrofotométrico a um comprimento de onda de 280 nm.

Tabela 4- Resultados das soluções padrão de insulina nas várias concentrações, a um comprimento de onda de 280 nm.

C (mg/mL)	Abs
0,0025	0,028
0,0050	0,042
0,0100	0,077
0,0200	0,097
0,0400	0,160
0,1000	0,383
0,2000	0,741

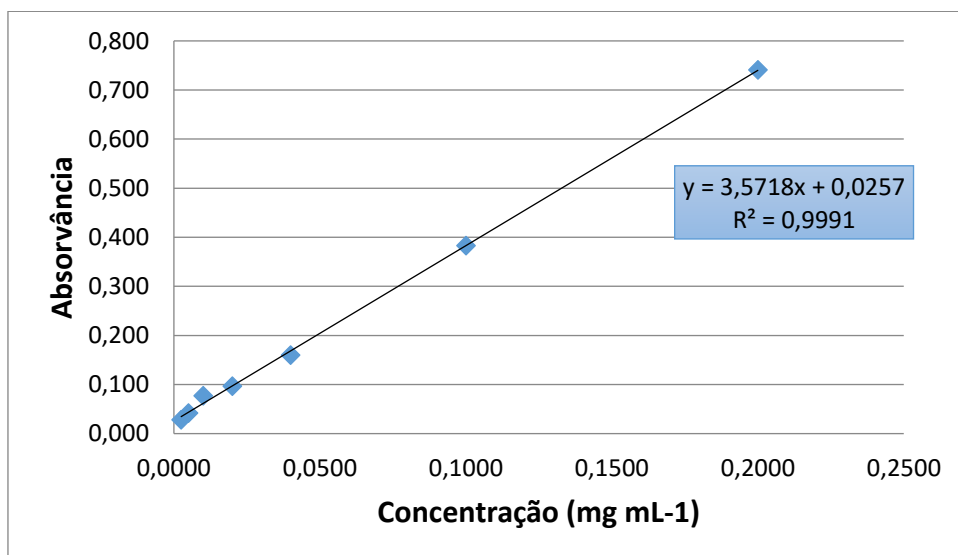


Figura 27 - Curva de calibração das soluções padrão de insulina a 280 nm.

Publicações

Apresentação do projeto intitulado “New formulation of oral insulin” em forma de poster no Simpósio Nacional Nano2016.pt, realizado na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias a 15 de abril de 2016.

